

Université de Montréal

**Effet de l'activation de PPAR $\gamma$  sur l'expression de la  
mPGES-1 et rôle des polymorphismes de PPAR $\gamma$  dans  
l'arthrose**

par

Saranette Cheng

Département des sciences biomédicales

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures  
en vue de l'obtention du grade de Maître ès sciences (M. Sc.)  
en sciences biomédicales

Décembre 2005

© Saranette Cheng, 2005



W

4

U58

2006

V. 070

## AVIS

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

## NOTICE

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Effet de l'activation de PPAR $\gamma$  sur l'expression de la mPGES-1 et rôle des  
polymorphismes de PPAR $\gamma$  dans l'arthrose**

présenté par

Saranette Cheng

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr Yves Raymond  
Président-rapporteur

Dr Hassan Fahmi  
Directeur de recherche

Dr Daniel Lajeunesse  
Codirecteur

Dr Giovanni (John) A. Di Battista  
Membre du jury

## ABRÉGÉ

L'arthrite est la principale cause d'invalidité de longue durée au Canada. Elle affecte plus de 5 millions de Canadiens. La forme la plus répandue de l'arthrite est l'arthrose (OA), qui affecte à elle seule une personne sur dix, soit 3 millions de Canadiens. L'arthrose est caractérisée par une dégradation du cartilage et du remodelage de l'os sous-chondral ainsi qu'une inflammation de la membrane synoviale. L'ensemble de ces modifications structurelles et fonctionnelles résulte en une perte importante de la mobilité.

La prostaglandine (PG)  $E_2$  ( $PGE_2$ ) est la principale PG produite au niveau articulaire et des niveaux élevés ont été détectés dans le sérum et le liquide synovial de patients souffrant d'arthrose. De nombreuses études effectuées *in vitro* et *in vivo* ont démontré que la  $PGE_2$  est responsable de la douleur, de l'enflure et de la destruction des tissus articulaires. La production de la  $PGE_2$  peut être induite par des cytokines pro-inflammatoires, notamment l'interleukine- $1\beta$  (IL- $1\beta$ ).

Les  $PGE_2$  synthases (PGES) catalysent l'étape terminale impliquée dans la biosynthèse de la  $PGE_2$ . Des travaux *in vitro* et *in vivo* ont montré que la PGES membranaire-1 (mPGES-1), dont l'activité est couplée à la cyclo-oxygénase-2 (COX-2), est responsable de la production induite de la  $PGE_2$ .

Les récepteurs des activateurs de proliférateur de peroxydase  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ), un facteur de transcription activé par les ligands, a été démontré pouvant réguler un nombre de gènes inflammatoires dans plusieurs types cellulaires.

Nous pensons qu'une inhibition de l'activité et/ou de l'expression de la mPGES-1 permettrait d'inhiber sélectivement la production de la PGE<sub>2</sub> et constituerait une stratégie plus efficace que les anti-inflammatoires nonstéroïdiens (AINS) dans le traitement de l'OA. Il est donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes qui régulent l'expression de la mPGES-1. De plus, il est bien établi que l'OA possède une composante génétique dans sa susceptibilité. Nous croyons qu'il existe une association entre deux polymorphismes du gène de PPAR $\gamma$  et la susceptibilité et/ou la sévérité de l'OA.

Dans un premier temps, nous avons étudié les effets des ligands de PPAR $\gamma$  sur la régulation de l'expression de la mPGES-1 dans les synoviocytes humains. Nos travaux ont montré que l'IL-1 $\beta$  induit l'expression de la mPGES-1 dans les synoviocytes isolés de genoux de patients arthrosiques. Les ligands de PPAR $\gamma$ , la 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$  prostaglandine J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) et la troglitazone (TRO), inhibent la production de la PGE<sub>2</sub> induite par l'IL-1 $\beta$  d'une manière dose-dépendante, ainsi que les expressions de protéine et d'ARNm de la mPGES-1 induite par l'IL-1 $\beta$ . La 15d-PGJ<sub>2</sub> et la TRO suppriment aussi l'activation du promoteur de la mPGES-1, confirmant que l'inhibition de la mPGES-1 se fait au niveau transcriptionnel. La surexpression de PPAR $\gamma$  de type sauvage amplifie, tandis que la surexpression d'un dominant négatif allège les effets inhibiteurs des ligands de PPAR $\gamma$ . De plus, un prétraitement avec un antagoniste de PPAR $\gamma$ , le GW9662, atténue les effets suppressifs des ligands de PPAR $\gamma$  sur l'induction de l'expression de la protéine de la mPGES-1, suggérant que l'inhibition de la mPGES-1 est médiée par PPAR $\gamma$ . Nous

avons aussi montré que la 15d-PGJ<sub>2</sub> et la TRO inhibent l'induction de la mPGES-1 en interférant avec l'activité de liaison induite par l'IL-1 $\beta$  du facteur de transcription Egr-1 à son site consensus.

La deuxième partie de nos travaux a pour objectif d'identifier la contribution de deux polymorphismes de PPAR $\gamma$ , la Pro<sup>12</sup>Ala et la C1431T, à la susceptibilité et à la sévérité de l'OA dans une population canadienne-française. Nos études polymorphiques démontrent que la différence des fréquences génotypiques et alléliques n'est pas significative entre les patients arthrosiques et les contrôles pour la Pro<sup>12</sup>Ala ou la C1341T. Également, aucune différence significative n'est observée après stratification des patients selon l'âge au début de la maladie, ou la sévérité fonctionnelle ou radiographique. Similairement, une analyse d'haplotypes des deux polymorphismes du gène de PPAR $\gamma$  n'a pu démontrer une association entre un haplotype et la susceptibilité ou la sévérité de l'OA.

En conclusion, d'une part, ces résultats définissent la mPGES-1 et Egr-1 en tant que nouvelles cibles de PPAR $\gamma$  et supportent l'application prometteuse des ligands de PPAR $\gamma$  dans le traitement de l'OA. D'autre part, nos résultats suggèrent que les polymorphismes étudiés du gène de PPAR $\gamma$  ne contribuent pas de manière significative à la susceptibilité ou à la sévérité de l'OA chez les Canadiens-Français.

Mots clés : arthrose, synoviocytes, IL-1 $\beta$ , mPGES-1, PPAR $\gamma$ , 15d-PGJ<sub>2</sub>, TRO, Egr-1, polymorphisme, susceptibilité, sévérité.

## ABSTRACT

Arthritis is the main cause of disability in Canada and affects more than 5 million Canadians. Osteoarthritis (OA), the most common form of arthritis, affects 3 million Canadians (1 in 10). It is characterized by cartilage degeneration, subchondral bone remodeling, and inflammation of the synovium. These structural and functional changes result in a loss of joint motion.

Prostaglandin (PG) E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) is the main PG detected in joint tissues and high levels of it have been detected in the serum and synovial fluid of OA patients. A number of *in vitro* and *in vivo* studies have demonstrated the role of PGE<sub>2</sub> in pain, swelling, and joint tissue destruction. PGE<sub>2</sub> production can be induced by pro-inflammatory cytokines, such as interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ).

PGE<sub>2</sub> synthases (PGES) catalyze the last step in the biosynthesis of PGE<sub>2</sub>. *In vitro* and *in vivo* studies have shown that microsomal PGES-1 (mPGES-1) activity is coupled to cyclo-oxygenase-2 (COX-2) and is responsible for the induced production of PGE<sub>2</sub>.

Peroxisome proliferator-associated receptors  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) is a ligand-activated transcription factor and was shown to regulate a number of inflammatory genes in several cell types.

We hypothesize that an inhibition of mPGES-1 activity and/or expression would result in a more selective inhibition of PGE<sub>2</sub> production and might constitute a more effective strategy in the treatment of OA. It is therefore necessary to better understand the molecular mechanisms which underlie the regulation of mPGES-1



expression. Moreover, it is well established that there exists a genetic component to OA susceptibility. We believe there is an association between two common PPAR $\gamma$  polymorphisms and the susceptibility to and/or the severity of OA.

Our first objective was to study the effects of PPAR $\gamma$  ligands on the regulation of mPGES-1 expression in human synoviocytes. We have shown that IL-1 $\beta$  induced mPGES-1 expression in synoviocytes obtained from knees of OA patients. PPAR $\gamma$  ligands, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$  prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) and troglitazone (TRO), inhibited IL-1 $\beta$ -induced PGE<sub>2</sub> production in a dose-dependent manner, as well as IL-1 $\beta$ -induced mPGES-1 protein and mRNA expression. 15d-PGJ<sub>2</sub> and TRO also inhibited the mPGES-1 promoter activity, confirming that mPGES-1 inhibition occurs at the transcriptional level. Overexpression of wild type PPAR $\gamma$  enhanced, whereas overexpression of a dominant negative allayed the inhibitory effects of PPAR $\gamma$  ligands. In addition, pretreatment with a PPAR $\gamma$  antagonist, GW9662, attenuated the suppressive effects of PPAR $\gamma$  ligands on mPGES-1 protein expression, suggesting that the inhibition of mPGES-1 is mediated by PPAR $\gamma$ . We have also shown that 15d-PGJ<sub>2</sub> and TRO inhibited the induction of mPGES-1 by interfering with the IL-1 $\beta$ -induced DNA binding activity of the transcription factor Egr-1.

In the second part of our work, our objective was to identify the contribution of two common PPAR $\gamma$  polymorphisms, Pro<sup>12</sup>Ala and C1431T, to the susceptibility to, and the severity of, OA in a French-Canadian population. Our studies demonstrate that genotypic and allelic frequencies for the Pro<sup>12</sup>Ala and C1431T were not significantly different between OA patients and control subjects. Moreover, no

significant differences were observed after stratification of OA patients according to age at the onset of disease, radiographic or functional severity. Similarly, haplotype analysis of both polymorphisms in the PPAR $\gamma$  gene showed no association of any haplotype with susceptibility to or severity of OA.

In conclusion, on one hand, our work defines mPGES-1 and Egr-1 as new targets of PPAR $\gamma$  and supports the promising role of PPAR $\gamma$  ligands in the treatment of OA. On the other hand, our polymorphism studies suggest that common PPAR $\gamma$  polymorphisms do not contribute significantly to the susceptibility to or severity of OA in French-Canadians.

Key words: osteoarthritis, synoviocytes, IL-1 $\beta$ , mPGES-1, PPAR $\gamma$ , 15d-PGJ<sub>2</sub>, TRO,

Egr-1, polymorphism, susceptibility, severity.

## TABLES DES MATIÈRES

<b>PAGE TITRE.....</b>	<b>i</b>
<b>ABRÉGÉ.....</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>vi</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES.....</b>	<b>ix</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX.....</b>	<b>xiii</b>
<b>LISTE DES FIGURES.....</b>	<b>xiv</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS.....</b>	<b>xv</b>
<b>DÉDICACE.....</b>	<b>xix</b>
<b>REMERCIEMENTS.....</b>	<b>xx</b>
 <b>A. INTRODUCTION.....</b>	 <b>1</b>
<b>I. L'arthrose (OA).....</b>	<b>1</b>
<b>I.1 La pathologie (changements biochimiques et métaboliques)...</b>	<b>2</b>
<b>I.2 Épidémiologie.....</b>	<b>3</b>
<b>I.3 Facteurs contribuant au développement de l'OA.....</b>	<b>4</b>
<b>I.3.1 Âge, genre.....</b>	<b>4</b>
<b>I.3.2 Obésité.....</b>	<b>4</b>
<b>I.3.3 Facteurs génétiques.....</b>	<b>4</b>
<b>I.4 Pathogenèse.....</b>	<b>5</b>
<b>II. L'articulation.....</b>	<b>6</b>
<b>II.1 L'os sous-chondral.....</b>	<b>9</b>
<b>II.2 Le cartilage.....</b>	<b>10</b>
<b>II.2.1 Structure et composition.....</b>	<b>11</b>
<b>II.2.2 Chimie du cartilage .....</b>	<b>12</b>

II.2.3 Le cartilage arthrosique.....	12
II.3 La membrane synoviale.....	13
II.3.1 Structure et composition.....	14
II.3.2 Inflammation de la membrane synoviale dans l'OA.....	16
II.4 Le fluide synovial.....	18
III. Les traitements.....	19
III.1 Les analgésiques.....	19
III.2 Les anti-inflammatoires nonstéroïdiens (AINS).....	20
III.2.1 L'aspirine.....	21
III.3 Les corticostéroïdes.....	23
III.4 L'exercice physique.....	24
III.5 La viscosupplémentation.....	24
III.6 La prothèse.....	25
III.7 Les approches complémentaires.....	25
IV. Les eicosanoïdes.....	26
IV.1 L'acide arachidonique.....	26
IV.2 Les prostaglandines.....	27
IV.2.1 La prostaglandine E <sub>2</sub> (PGE <sub>2</sub> ).....	29
IV.3 Les cyclo-oxygénases (COX).....	30
IV.3.1 COX-1.....	31
IV.3.2 COX-2.....	32
IV.3.3 COX-3.....	35
IV.4 Les PGE synthases (PGES).....	36
IV.4.1 cPGES.....	37
IV.4.2 mPGES-1.....	38
IV.4.2.1 Niveau basal de la mPGES-1.....	38
IV.4.2.2 Régulation de l'expression de la mPGES-1.....	39

IV.2.2.3	Fonctionnement couplé de la mPGES-1 et de la COX-2.....	40
IV.2.2.4	Structure du gène de la mPGES-1.....	41
IV.2.2.5	Inhibition de la mPGES-1.....	42
IV.2.2.6	La mPGES-1 dans les tissus articulaires (OA, AR et normaux).....	43
IV.2.2.7	Modèles animaux de la mPGES-1.....	46
IV.4.3	mPGES-2.....	47
IV.4.4	Autres PGES.....	48
V.	Récepteur des activateurs de proliférateur de péroxysome (PPAR).....	48
V.1	Les classes de PPAR.....	48
V.2	Les polymorphismes dans le gène de PPAR $\gamma$ .....	50
V.2.1	Pro <sup>12</sup> Ala.....	51
V.2.1	C1431T.....	53
V.3	Les ligands de PPAR $\gamma$ .....	53
V.3.1	15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J <sub>2</sub> (15d-PGJ <sub>2</sub> ).....	56
V.3.2	Troglitazone (TRO).....	57
V.4	PPAR $\gamma$ dans les tissus articulaires.....	58
V.5	Propriétés anti-inflammatoire de PPAR $\gamma$ .....	60
V.6	Modèles animaux impliquant l'activation de PPAR $\gamma$ .....	61
V.7	Mécanismes d'action de PPAR $\gamma$ .....	62
V.7.1	Mécanisme d'action via PPAR $\gamma$ .....	65
V.7.2	Mécanisme d'action indépendant de PPAR $\gamma$ .....	65
B.	HYPOTHÈSE DE RECHERCHE ET OBJECTIFS.....	67

<b>C. MANUSCRITS.....</b>	<b>69</b>
<b>I. Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor <math>\gamma</math></b>	
Inhibits Interleukin- $1\beta$ -Induced mPGES-1 Expression in Human	
Synovial Fibroblasts by Interfering with Egr-1.....	70
<b>II. Association of Polymorphisms in the Peroxisome</b>	
Proliferator-Activated Receptor- $\gamma$ Gene and Osteoarthritis of the Knee...	113
<b>D. DISCUSSION.....</b>	<b>137</b>
<b>I. Perspectives.....</b>	<b>146</b>
<b>E. CONCLUSION.....</b>	<b>149</b>
<b>F. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>	<b>151</b>

## LISTE DES TABLEAUX

Tableau I : Comparaison des principales caractéristiques de la COX-1 et de la COX-2.....	33
Tableau II : Comparaison des propriétés des PGES.....	38
Tableau III : Affinité des ligands naturels pour les isoformes des PPARs.....	55
Tableau IV : Affinité des ligands synthétiques pour les isoformes des PPARs....	56

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Caractéristiques morphologiques des structures de l'articulation.....	3
Figure 2 : Structures générales d'une articulation.....	8
Figure 3 : Morphologie d'une membrane synoviale montrant les couches intimales et les couches sous-intimales.....	15
Figure 4 : Représentation schématique de la membrane synoviale articulaire.....	16
Figure 5 : Représentation d'une membrane synoviale enflammée.....	17
Figure 6 : Voies de biosynthèse des PGs à partir de l'AA.....	28
Figure 7 : Représentation des éléments régulateurs dans les promoteurs humains des gènes de la COX-1 et de la COX-2.....	33
Figure 8 : Représentation de la fonction couplée et de la localisation entre les COXs et les PGES.....	41
Figure 9 : Représentation schématique de la structure secondaire et des polymorphismes du gène de PPAR $\gamma$ .....	51
Figure 10 : Mécanismes d'action de PPAR $\gamma$ par les ligands.....	64



## LISTE DES ABRÉVIATIONS

15d-PGJ <sub>2</sub>	15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine J <sub>2</sub>
9-HODE	Acide hydroxy-octadeca-9Z,11E-dienoïque
A	Adénine
AA	Acide Arachidonique
AAS	Acide Acétylsalicylique
ADN	Acide Désoxyribonucléique
AINS	Anti-inflammatoires Nonstéroïdiens
Ala	Alanine
AMPc	Adénosine Monophosphate Cyclique
AP-1	<i>Activating Protein-1</i> ou protéine activatrice-1
AR	Arthrite Rhumatoïde
ARN	Acide Ribonucléique
ARNm	ARN Messenger
ATP	Adénosine Triphosphate
C	Cytosine
C/EBP	<i>CCAAT/Enhancer Binding Protein</i>
CBP	Protéine de liaison de CREB
CDNB	1-chloro-2,4-dinitrobenzène
ChIP	Immunoprécipitation de la Chromatine
CI	Concentration Inhibitrice
COX	Cyclo-oxygénase
CRE	Élément de Réponse de l'AMPc
CREB	<i>cAMP-Response Element-Binding protein</i> ou Protéine de liaison de l'élément de réponse de l'AMPc
DBD	<i>DNA Binding Domain</i> ou Domaine de liaison à l'ADN
DHA	Acide Docosahexaénoïque
DR-1	<i>Direct Repeat-1</i>

Egr-1	<i>Early Growth Response factor-1</i> ou Facteur de réponse de croissance précoce
EP	Récepteur de la prostaglandine E <sub>2</sub>
EPA	Acide Eicopentaenoïque
ERK	<i>Extracellular Signal-Regulated Kinase</i>
FLAP	<i>Five-Lipoxygenase-Activating Protein</i> ou Protéine activatrice de la 5-lipoxygénase
G	Guanine
GPCR	Récepteurs couplés à la protéine G
GRIP-1	<i>Glucocorticoid Receptor Interacting Protein-1</i> ou Protéine interagissant avec le récepteur de glucorticoïde
GSH	Glutathione
GST	Glutathione-S-transférase
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peroxyde d'Hydrogène
HAT	Histone Acétyltransférase
Hsp90	Protéine de choc thermique 90
ICAM-1	<i>Intracellular Adhesion Molecule-1</i>
IFN-γ	Interféron Gamma
IGF	Facteur de croissance analogue à l'insuline
IL	Interleukine
LBD	<i>Ligand Binding Domain</i> ou Domaine de liaison du ligand
IMC	Indice de Masse Corporelle
LPS	Lipopolysaccharide
LT	Leucotriène
LTCS	<i>Leukotriène C<sub>4</sub> Synthase</i>
MAP	<i>Mitogen-Activated Protein</i>
MAPK	<i>Mitogen-Activated Protein Kinase</i>
MAPEG	<i>Membrane-Associated Proteins involved in Eicosanoid and Glutathione</i>
MGST1-L1	<i>Microsomal GST-1-Like-1</i>
MIA	Mono-iodoacétate

MMP	<i>Matrix Metallo-Proteinase</i> ou Métalloprotéase Matricielle
MSM	Méthylsulfonylméthane
N-CoR	<i>Nuclear Receptor Corepressor</i> ou Corépresseur de récepteur nucléaire
NFAT	<i>Nuclear Factor of Activated T cells</i> ou Facteur nucléaire des cellules T activées
NF-IL6	Facteur Nucléaire-Interleukine 6
NF-κB	Facteur de transcription nucléaire κB
NO	Monoxyde d'Azote
NOS	Monoxyde d'Azote Synthase
iNOS	Monoxyde d'Azote Synthase Inductible
OA	Arthrose
PG	Prostaglandine
PGD <sub>2</sub>	Prostaglandine D <sub>2</sub>
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandine E <sub>2</sub>
PGES	Prostaglandine E Synthase
cPGES	Prostaglandine E Synthase Cytosolique
mPGES	Prostaglandine E Synthase Membranaire
PGF <sub>2α</sub>	Prostaglandine F <sub>2α</sub>
PGG <sub>2</sub>	Prostaglandine G <sub>2</sub>
PGH <sub>2</sub>	Prostaglandine H <sub>2</sub>
PGHS	Prostaglandine Endoperoxide H Synthase
PGI <sub>2</sub>	Prostaglandine I <sub>2</sub>
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
cPLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub> Cytosolique
sPLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub> Sécrétoire
PLC <sub>2</sub>	Phospholipase C <sub>2</sub>
POX	Peroxydase
PPAR	<i>Perosisome Proliferator-Activated Receptor</i> ou Récepteur des activateurs de proliférateur de péroxysome
PPRE	Élément de réponse de PPAR

Pro	Proline
PTH	Parathormone
RXR	Récepteur X de l'Acide 9-cis-rétinoïque
SNP	Polymorphisme de simple nucléotide
SRC-1	<i>Steroid Receptor Coactivator-1</i> ou Coactivateur du récepteur de stéroïde
T	Thymine
TGF- $\beta$	<i>Transforming Growth Factor <math>\beta</math></i> ou Facteur de croissance transformant $\beta$
TNF- $\alpha$	<i>Tumor Necrosis Factor <math>\alpha</math></i> ou Facteur de nécrose tumorale $\alpha$
TRO	Troglitazone
TX	Thromboxane
TXA <sub>2</sub>	Thromboxane A <sub>2</sub>
TZD	Thiazolidinedione

*À Papa et Maman, Tiga,  
À Mack Thoi,  
À Yoon Ho,*

*Pour votre appui et vos encouragements,  
Et surtout pour votre amour et votre confiance,  
Je vous dédie ce mémoire.*

## REMERCIEMENTS

Je remercie tous les gens qui, d'une manière directe ou indirecte, ont participé à la réalisation de ce mémoire de maîtrise.

Je tiens, tout d'abord, à remercier mon directeur de recherche, le Dr Hassan Fahmi, pour m'avoir donné l'opportunité de faire ma maîtrise dans son laboratoire de recherche. Je suis très reconnaissante pour la formation que j'ai obtenue, les conseils qui m'ont été suggérés, ainsi que la disponibilité et le souci qui m'ont été accordés.

Je remercie également le Dr Daniel Lajeunesse, mon codirecteur, pour son soutien, sa disponibilité et son ouverture d'esprit.

J'aimerais remercier aussi le Dre Johanne Martel-Pelletier et le Dr Jean-Pierre Pelletier de m'avoir reçue à dans l'Unité de recherche en arthrose, où j'ai pu réaliser mes travaux. Je remercie aussi tous les membres de l'Unité de recherche en arthrose et plus particulièrement, David et ChangShan, pour leurs conseils techniques et leur expertise. Je remercie également Afif et Xinfang pour leur soutien et les discussions enrichissantes.

Je tiens à remercier mes amis dont j'ai grandement apprécié la présence, et qui ont fait de ce séjour une expérience agréable et stimulante; Christelle, pour tous les conseils judicieux, autant sur les plans professionnel que personnel; Alex, pour son esprit joyeux et positif, son support et son amitié; Kath, pour sa complicité, son enthousiasme et son amitié; ainsi que mes 'girlfriends' pour tous les bons moments partagés.

En dernier lieu, je remercie aussi le programme de formation MENTOR et le programme de sciences biomédicales de l'Université de Montréal pour le support financier, sans lequel la réalisation de cette maîtrise n'aurait pas été possible.

## A. INTRODUCTION

### I. L'arthrose

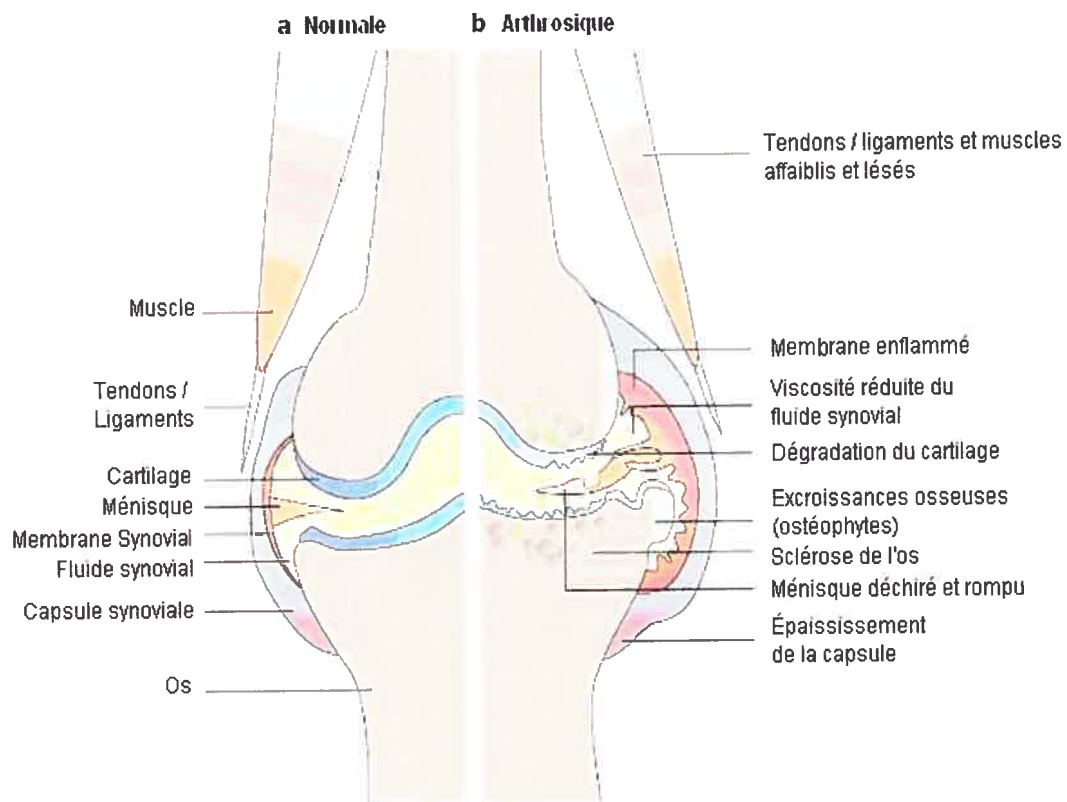
Les maladies arthritiques sont parmi les maladies les plus invalidantes et affectent plus de 5 millions de Canadiens, soit un Canadien sur six. Les estimations prévoient que ce nombre doublera d'ici 30 ans en raison du vieillissement de la population. La douleur et la dégénération progressive des articulations et de leurs tissus sont les principales caractéristiques de ces maladies, résultant en une diminution de la qualité de vie des personnes souffrant de maladies arthritiques (Lagacé *et al*, 2003). L'arthrite se classe en troisième position parmi les maladies chroniques les plus fréquentes au Canada. Parmi ces maladies, l'arthrose (OA), aussi connue sous le nom d'ostéoarthrite, affecte à elle seule plus de 3 millions de Canadiens, soit une personne sur dix. Elle est la principale cause des consultations cliniques et coûte plus de 4,4 milliards de dollars au gouvernement canadien chaque année. Les coûts des médicaments prescrits pour l'arthrite augmentent et atteignent près de 270 millions de dollars par année (Stokes *et al*, 2003). Les symptômes de l'OA comprennent la douleur, l'œdème qui peut être accompagné de chaleur au niveau de l'articulation, de raideur articulaire, de rougeur et des crépitements. L'articulation affectée grossit et enfle, peut devenir déformée, induire des changements de posture et éventuellement la perte de mobilité (Peach *et al*, 2005). L'OA peut affecter n'importe quelle articulation, mais semble affecter principalement le genou, la hanche, le gros orteil, la main et la colonne vertébrale (Berenbaum, 2001).

### 1.1 La pathologie

L'OA est une maladie dégénérative des articulations. Elle se caractérise par une perte dégénérative du cartilage articulaire, accompagnée d'une sclérose de l'os sous-chondral, de la formation d'ostéophytes aux marges de l'articulation, qui sont des excroissances osseuses et d'une légère à sévère inflammation non spécifique des tissus synoviaux (Figure 1). Ceci entraîne des déformités et la perte de l'alignement des os longs adjacents (Peach *et al*, 2005). L'inactivité causée par les douleurs articulaires occasionne habituellement une perte des muscles ainsi que des contractures des tissus mous. Pendant la progression de l'OA, des changements biochimiques et métaboliques se manifestent dans la matrice extracellulaire du cartilage et provoquent un déséquilibre de l'homéostasie de celui-ci. Ceci altère les propriétés biomécaniques du cartilage qui sont importantes dans la répartition du poids.

La douleur est le symptôme prédominant dans l'OA. Elle est de nature multidimensionnelle, et résulte des interactions entre l'inflammation et d'autres propriétés de la maladie telles que la sévérité radiologique (Cicuttini *et al*, 1996), l'innervation des structures articulaires (Gill *et al*, 2004), la sensibilisation centrale et périphérique (Niissalo *et al*, 2002) et les facteurs psychologiques (Bradley *et al*, 1999). La douleur dans les maladies arthritiques est caractérisée par l'hyperalgésie et la douleur spontanée (Schaible *et al*, 2002). Même si l'OA n'est pas classifiée principalement comme une arthropathie inflammatoire, les patients arthrosiques manifestent de l'inflammation locale et des synovites (Goldring, 2000).





**Figure 1 :** Caractéristiques morphologiques des structures de l'articulation **a.** normale et saine; **b.** OA. (d'après Wieland *et al*, 2005).

## 1.2 Épidémiologie

L'OA est la maladie articulaire la plus répandue en Amérique du Nord et elle est une des principales causes d'infirmité et de douleur chez les personnes âgées. Plusieurs études épidémiologiques associent cette condition à la prédilection pour les articulations des jambes supportant un poids et certaines articulations de la main.

Cette maladie est multifactorielle et plusieurs facteurs contribuent au développement et à la progression de l'OA tels que l'obésité, la densité osseuse, les traumatismes et les stress répétitifs ainsi que les facteurs génétiques.

### *1.3 Facteurs contribuant au développement de l'OA*

#### *1.3.1 Âge, genre*

Cette maladie affecte deux fois plus de femmes que d'hommes chez les 50 ans et plus. Par contre, chez les moins de 50 ans, les hommes sont plus affectés par l'OA que les femmes (Felson *et al*, 1998). Malgré tout, la prévalence de l'OA dans les articulations est directement reliée à l'âge (Felson, 2004).

#### *1.3.2 L'obésité*

Plusieurs études sur les populations (Felson *et al*, 1997; Al-Arfaj, 2002) ont démontré que l'excès de poids est un facteur important dans le développement de l'OA. Les femmes obèses ont quatre à cinq fois plus de chance de développer l'OA du genou que les personnes ayant un poids dit santé (Berenbaum, 2001). La perte de poids est souvent recommandée pour ces personnes afin d'estomper les symptômes de l'OA.

#### *1.3.3 Les facteurs génétiques*

Des études épidémiologiques ont démontré que les facteurs génétiques sont une composante importante de l'OA. Ces études suggèrent qu'il existe une hérédité

de type multifactorielle plutôt qu'un défaut d'un simple gène (Peach *et al*, 2005). L'hérédité de l'OA primaire des mains a été démontrée chez 65 % des patients (Spector *et al*, 1996). L'incidence de l'OA des mains ou d'autres formes d'OA dans une certaine famille implique généralement une composante génétique. Des études montrent que la cause de cette hérédité est liée à une mutation dans les composantes de la matrice extracellulaire telles que le collagène de type II et IX, et l'aggrécane (Spector *et al*, 1996). D'autre part, il est possible que plusieurs autres gènes soient impliqués dans la prédisposition à l'OA. Parmi les gènes impliqués en association avec l'OA, se trouvent le VDR, le gène du récepteur de la vitamine D ainsi que le gène ESR1, le gène du récepteur de l'œstrogène (Uitterlinden *et al*, 1997; Loughlin *et al*, 2000). Des études effectuées sur des jumeaux ont démontré clairement que l'OA est héréditaire sur plusieurs sites squelettiques tels que les mains, les hanches, les genoux et la colonne vertébrale (Loughlin, 2001; Loughlin, 2002). De plus, une étude récente basée sur une population australienne a conclu que les risques génétiques associés à l'OA sont médiés par les effets de la force musculaire et de la région médiale du tibia, ce qui permet d'affirmer que l'OA est une maladie de l'articulation et non seulement d'un tissu en particulier (Jones *et al*, 2004).

#### *1.4 Pathogenèse*

Dans le cartilage articulaire, il existe une homéostasie physiologique dirigée par les chondrocytes, cellules uniques du cartilage. Ces chondrocytes sont responsables de la synthèse et de la régulation des composantes de la matrice

extracellulaire. Ces macromolécules sont le collagène (principalement de type II, IX, XI), les protéoglycanes (principalement l'aggrécane) et les protéases (Berenbaum, 2001). Ces composantes sont nécessaires pour la rétention des molécules d'eau, contribuant ainsi à la résistance aux forces de friction et au stress de mise en charge. Une perturbation de cette homéostasie entre la synthèse et la dégradation de la matrice extracellulaire entraîne nécessairement l'OA. Ce déséquilibre est causé par une surproduction de protéases qui dégradent les collagènes et les aggrécanes, et une réduction dans la synthèse d'inhibiteurs naturels de ces protéases. Cette altération est la conséquence de l'activation des tissus par des cytokines, des médiateurs lipidiques (c'est-à-dire les prostaglandines), les radicaux libres (monoxyde d'azote (NO), peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ )) et les constituants de la matrice elle-même. La dégénération des tissus articulaires peut être causée par les chondrocytes du cartilage, les tissus synoviaux de même que de l'os sous-chondral (Berenbaum, 2001).

## **II. L'articulation**

Une articulation est décrite comme étant le point de contact entre deux os, entre un os et le cartilage, lesquels peuvent interagir de plusieurs façons dans le but de servir au fonctionnement du système musculosquelettique. Il existe trois principaux types fonctionnels d'articulation : la synarthrose, permettant aucun mouvement tel que les os crâniens; l'amphiarthrose, où il y a possibilité de petits mouvements tels que les articulations entre les petits os de la main ou du pied; et la diarthrose, permettant un mouvement ample, mais limité par les ligaments environnants. La

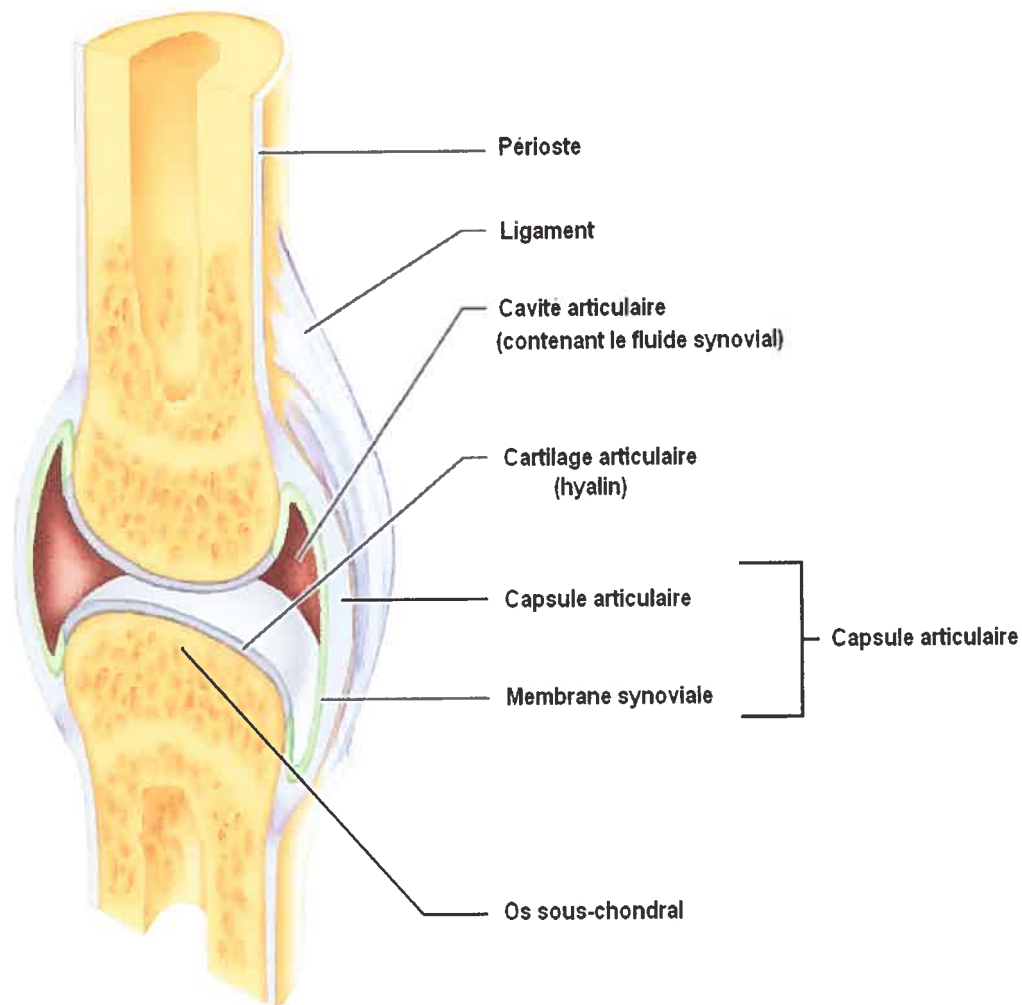
dernière classe d'articulation est la plus commune. Les articulations de cette catégorie possèdent une membrane synoviale sécrétant du fluide synovial, et sont également nommées articulations synoviales (Simkin, 2001).

Les articulations sont aussi divisées en trois groupes structuraux et leur classification dépend de la présence d'une cavité et de tissus conjonctifs. Il y a l'articulation fibreuse, où la cavité est absente et où les os sont retenus par des tissus conjonctifs denses et fibreux. L'articulation cartilagineuse, quant à elle, ne possède pas de cavité et les os sont reliés par du cartilage. La dernière catégorie structurelle d'articulation est l'articulation synoviale, où une cavité articulaire est présente et où les os sont reliés d'une manière moins étanche par une capsule articulaire et des ligaments que l'on nomme diarthrose.

L'articulation diarthrose ou synoviale mobile est un organe complexe. Elle est composée d'une cavité articulaire remplie par un liquide synovial qui sépare les deux os et est soutenue et renforcée par des ligaments (Figure 2). Les extrémités osseuses sont couvertes de cartilage (de type hyalin) lisse et poli qui permet d'obtenir un mouvement sans friction entre les extrémités osseuses en aidant à absorber les chocs mécaniques lors de la mise en charge.

La stabilité de l'articulation, tout en permettant le mouvement, est gouvernée par plusieurs facteurs. La forme de l'articulation, c'est-à-dire la manière dont celle-ci est configurée et assemblée, permet à une articulation normale de se plier et d'être flexible. Les ligaments sont une autre source de stabilité puisqu'ils guident et alignent l'articulation tout en respectant l'amplitude articulaire. Les muscles et les tendons, quant à eux, aident à l'amplification d'un mouvement efficace. Le liquide

synovial contribue aussi à la stabilité de l'articulation puisqu'il permet les mouvements libres entre les surfaces cartilagineuses, tout en résistant efficacement aux forces de friction. De plus, la pression intra-articulaire dans un genou normal au repos contribue à la force de stabilité (Simkin *et al*, 2001).



**Figure 2 :** Structures générales d'une articulation synoviale  
(modifiée de [www.tbcc.cc.or.us/~bobp/bi231/Joints.pdf](http://www.tbcc.cc.or.us/~bobp/bi231/Joints.pdf) )

## II.1 L'os sous-chondral

L'extrémité osseuse recouverte par le cartilage se nomme l'os sous-chondral. Une fois transmis au cartilage, l'énergie de chargement des chocs absorbés est transférée principalement à l'os (Radin, 1979). Dans des conditions arthrosiques, les activités dans l'os sous-chondral sont augmentées, c'est-à-dire que l'os est renforcé par des durillons en tentant de réparer les dommages, menant à la formation d'ostéophytes (Westacott, 2002). En fait, il existe un métabolisme de l'os ou un remodelage osseux, c'est-à-dire qu'il y a une formation et une résorption de l'os. Les facteurs qui influencent ce remodelage sont les hormones (la parathormone (PTH), la calcitonine, etc.) et la réponse au stress mécanique. Il y a trois types de cellules qui contrôlent cette dynamique du métabolisme osseux : les ostéoblastes, les ostéocytes et les ostéoclastes. Les ostéoblastes sont les cellules responsables de la synthèse et de la régulation de la déposition et de la minéralisation de la matrice extracellulaire osseuse. Une fois incorporés dans la matrice osseuse, les ostéoblastes sont nommés ostéocytes. Les ostéocytes sont les senseurs des signaux mécaniques. Les ostéoclastes, quant à eux, déminéralisent l'os et sa proximité, et sont donc responsables de la résorption osseuse (Boskey, 2001).

Les principaux changements osseux sont la sclérose osseuse de l'os spongieux subarticulaire et la formation d'ostéophytes, ou plutôt d'ostéochondrophytes, qui sont des excroissances d'os à l'extrémité de l'articulation (Grynpas *et al*, 1991). À un stade plus avancé de la maladie, le processus d'ossification endochondrale est observé, c'est-à-dire une formation de l'os qui se fait à la place du cartilage hyalin,

accompagnée d'angiogénèse qui peut même pénétrer le cartilage et exposer des bouts d'os lisses et denses à la surface articulaire, également appelée éburnation (Wieland *et al*, 2005).

Dans des conditions arthrosiques, le métabolisme cellulaire osseux est différent que dans des conditions normales (Westacott, 2002). L'os sous-chondral est vascularisé et cette caractéristique est importante pour l'intégrité du cartilage puisque ce dernier ne l'est pas. Les deux métabolismes, celui de l'os et celui du cartilage, sont donc reliés et s'échangent des informations pour l'équilibre de l'articulation. Les changements pathologiques structurels dans l'OA se font dans l'os sous-chondral cortical et l'os trabéculaire et dans les structures subarticulaires. Ces changements de remodelage se font surtout au niveau de l'interface de os-cartilage, et principalement sous les régions endommagées du cartilage. L'os s'épaissit et les mécanismes derrière cette réaction ne sont pas encore résolus, mais on sait que certains facteurs biomécaniques et pathobiochimiques sont impliqués. De nombreuses équipes s'intéressent à ce sujet et leurs avis divergent : certains disent que les changements osseux se font en premier lieu, d'autres sont convaincus que la dégradation du cartilage est l'élément déclencheur dans l'OA. Cette question reste encore sans réponse puisque les patients arthrosiques manifestent souvent leurs symptômes quand la maladie est à un stade avancé (Felson *et al*, 2004).

## *II.2 Le cartilage*

Dans une articulation normale, le cartilage est un tissu solide et souple qui



couvre l'extrémité osseuse. La solidité et la durabilité du cartilage font de celui-ci une composante de l'articulation très intrigante. Ses deux rôles principaux sont de réduire la friction entre les deux extrémités osseuses et d'absorber les chocs causés par les mouvements, faisant de celui-ci un absorbeur de chocs hydraulique (Mow *et al*, 1980).

### *II.2.1 Structure et composition*

Le cartilage normal est de couleur blanche et translucide (Goldring, 2001). C'est un tissu non vascularisé et innervé qui, par diffusion, est alimenté par l'os sous-chondral et le liquide synovial. Sa matrice extracellulaire est composée de fibres de collagène et d'un réseau de protéoglycanes. Les fibres de collagène sont responsables de l'élasticité du cartilage qui donne sa résistance à la traction, tandis que les mailles de protéoglycanes lui fournissent sa rigidité par leurs habilités d'absorber et de rejeter l'eau. Le cartilage est un tissu plutôt hypocellulaire puisqu'il n'est composé que de 1 %-2 % de son volume total par les chondrocytes (Stockwell *et al*, 1979). Les chondrocytes, le seul type cellulaire dans le cartilage, sont responsables de la production de nombreux facteurs de croissances, de cytokines, de chimiokines, d'enzymes protéolytiques et de nombreuses macromolécules de la matrice du cartilage (Berembaum, 2004; Haringman *et al*, 2004). Le renouvellement métabolique du collagène est extrêmement lent, sa demi-vie étant de 117 ans (Verzijl *et al*, 2000). Les chondrocytes possèdent un potentiel de remplacement du collagène limité dans le cartilage articulaire adulte, malgré leur habilité à synthétiser les protéoglycanes de manière continue. Conséquemment, les chondrocytes adultes ont

une capacité limitée de réparation de la matrice extracellulaire et remplacent le cartilage endommagé ou âgé par du tissu fibrogène de collagène de type I. Le liquide synovial joue un rôle de lubrifiant entre les surfaces du cartilage et il est aussi une source de nutriments pour les chondrocytes (Goldring, 1991).

### *II.2.2 Chimie du cartilage*

Le cartilage est formé d'eau à 70 %. Deux composantes, le collagène de type II et les aggrécanes, constituent plus de 90 % de la masse sèche du cartilage (Mayne, 1997; Sandy *et al*, 1997). Les collagènes de type VI, IX, XI, XII et XIV sont aussi présents en quantité mineure et pourraient jouer des rôles fonctionnels et structurels dans le cartilage (Mayne, 1997; Olsen, 1997). Le réseau de fibres de collagène intercalé d'agrégats de protéoglycanes est responsable des propriétés physiques de résilience et de résistance à la traction du cartilage articulaire. Les protéoglycanes sont associés à de nombreuses molécules d'eau qui elles, sont liées aux chaînes de glycosaminoglycans. La matrice extracellulaire étant fortement liée aux molécules d'eau, elle fournit un niveau de résistance élevé aux déformations dues aux forces compressives (Goldring, 1991). Il existe, par ailleurs, d'autres protéines dans la matrice qui participent à l'intégrité de la matrice du cartilage telles que la fibronectine et la tenascine-c qui aident à médier les interactions cellule-matrice du cartilage (Olsen, 1997).

### *II.2.3 Le cartilage arthrosique*

Les différents facteurs mentionnés plus haut conduisant à un déséquilibre du

cartilage arthrosique incitent alors à sa dégradation, inhibant sa capacité de se régénérer et rompt ainsi son homéostasie. Les chondrocytes produisent de nombreux médiateurs associés à l'inflammation tels que les cytokines et les chimiokines ainsi que les enzymes protéolytiques capables d'endommager le cartilage (Wieland *et al*, 2005). Parmi ces médiateurs, l'interleukine-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), les métalloprotéases (MMPs), les facteurs de croissance et les radicaux libres sont ceux qui contribuent de manière significative à la dégradation du tissu cartilagineux. Étant donné que les réactions cataboliques l'emportent sur les réactions anaboliques, le cartilage se dégrade. L'IL-1 $\beta$ , qui est produit par les chondrocytes et les synoviocytes, active les protéases telles que les MMPs. Les MMPs sont des enzymes qui clivent les fibres de collagène (MMP-1, -8 et -13) et les protéoglycanes (MMP-3). De plus, l'IL-1 $\beta$  et le facteur de nécrose tumorale- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) induisent l'expression de la cyclo-oxygénase-2 (COX-2) et la production de la prostaglandine E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) dans les tissus articulaires, deux intermédiaires associés à l'inflammation (Martel-Pelletier *et al*, 2003; Fahmi *et al*, 2002). En somme, les changements établis lors de la rupture de l'homéostasie du cartilage semblent mener à un cercle vicieux puisqu'un évènement en engendre un autre, tous de nature cataboliques. Par conséquent, le cartilage se calcifie lentement et se dégrade éventuellement.

### *II.3 La membrane synoviale*

La membrane synoviale est la couche de tissu collagèneux sous-jacente au ligament ou au périoste, souvent trouvée antérieurement aux condyles fémoraux. Elle

couvre tous les tissus articulaires et assure la stérilité de l'articulation. Elle sert de point de détachement entre les structures adjacentes permettant ainsi une mobilité à l'articulation. De plus, elle sert de réserve pour la nutrition des chondrocytes et aide au contrôle du volume et de la composition du liquide synovial (Klippel *et al*, 2001).

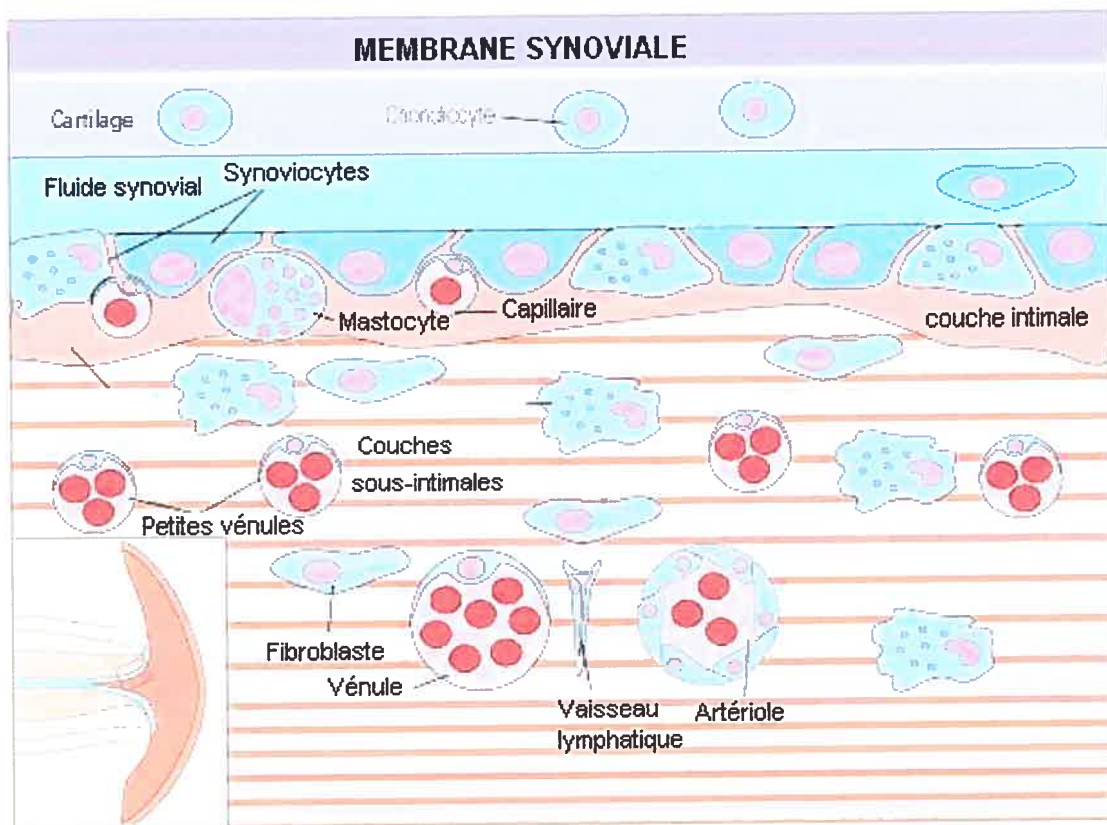
### *II.3.1 Structure et composition*

La membrane synoviale est composée de tissus conjonctifs et possède une surface lisse qui tapisse la cavité articulaire. Elle a l'apparence d'une monocouche de cellules, nommée la couche intinale, mais en fait, elle est composée de plusieurs couches. Les couches sous-intinales sont délimitées de la couche intinale par un réseau de microvascularisation (Figures 3 et 4). Les couches sous-intinales accordent les propriétés de mobilité et de compactage à la membrane (Edwards, 2001).

La couche intinale de la membrane est constituée d'une matrice riche en microfibrilles de collagène de type VI qui sont importantes pour l'intégrité structurelle. La membrane basale de cette matrice est composée d'éléments tels que la laminine, les protéoglycanes riches en chondroïtine sulphate et le collagène de type IV (Revell *et al*, 1995).

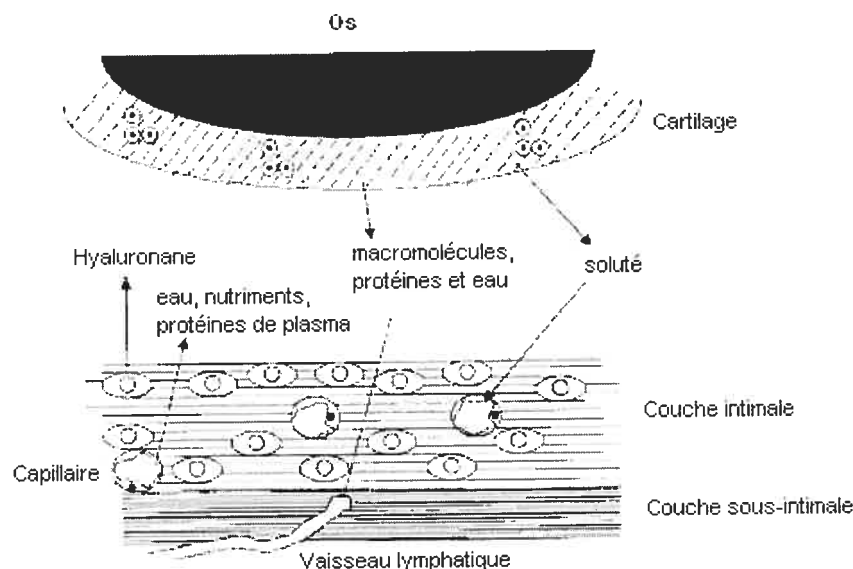
Les deux principaux types cellulaires résidant dans la couche intinale de la membrane synoviale normale sont les synoviocytes de type A et de type B. Les synoviocytes de type A sont des cellules dérivées des monocytes qui ressemblent à des macrophages dus à son nombre élevé d'organelles cytoplasmiques qui incluent les lysosomes, les vacuoles à bord lisse et les vésicules micropinocytotiques. D'un

autre côté, les synoviocytes de type B sont de type fibroblastique et possèdent un nombre moins élevé d'organelles, en plus de posséder un réticulum endoplasmique plus important. Des mastocytes, et plus rarement, des globules blancs sont parfois apparents dans la membrane synoviale normale (Edwards, 2001).



© www.rheumtext.com - Hochberg et al (eds)

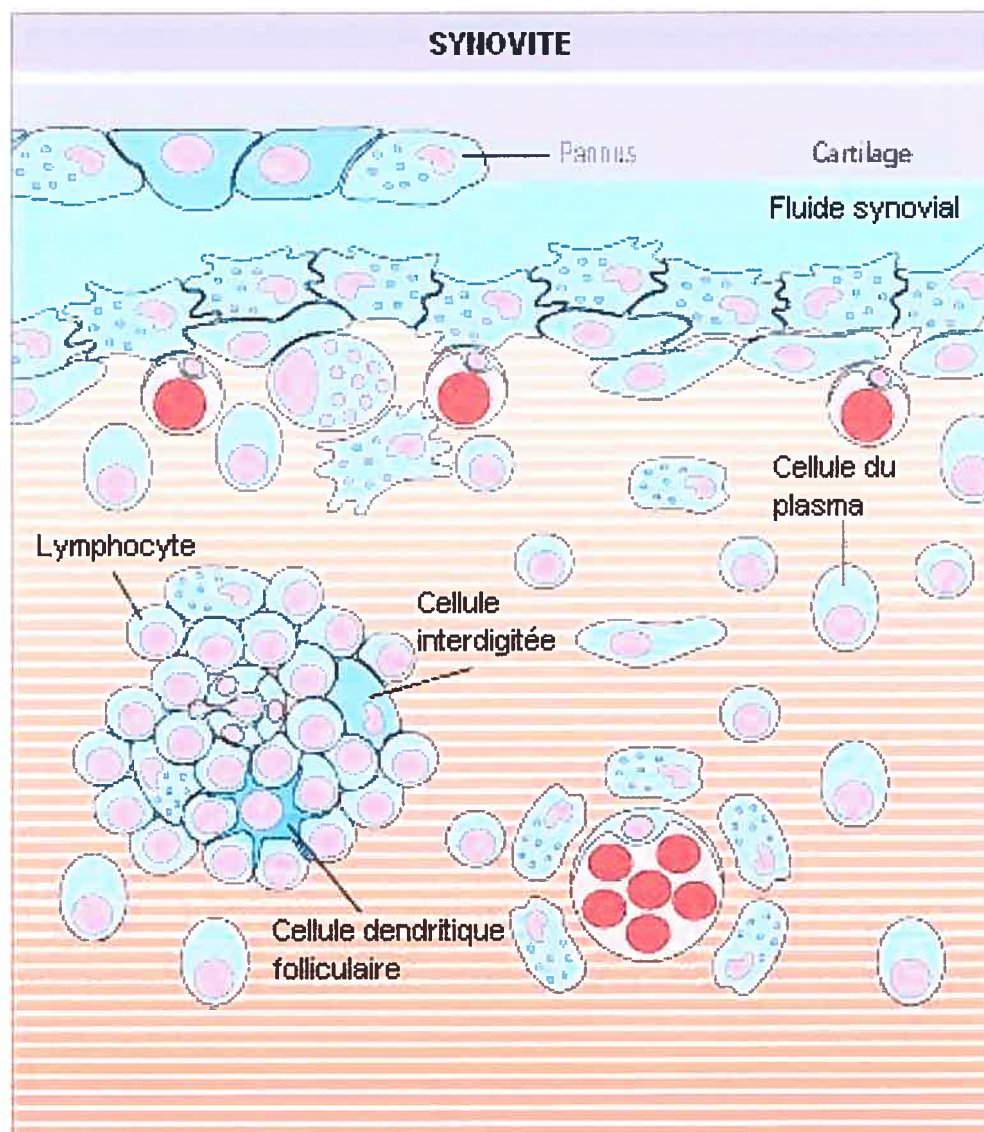
**Figure 3 :** Morphologie d'une membrane synoviale montrant les couches intinales et les couches sous-intimales (adaptée de Simkin *et al*, 2003).



**Figure 4 :** Représentation schématique de la membrane synoviale articulaire (modifiée de Garnero *et al*, 2000)

### II.3.2 Inflammation de la membrane synoviale dans l'OA

L'inflammation de la membrane synoviale d'une manière non érosive est commune dans l'OA, même si l'inflammation n'est pas le premier symptôme dans l'OA (Brandt, 1999) puisque contrairement à l'arthrite rhumatoïde (AR), l'inflammation de la membrane se développe postérieurement aux processus impliqués dans la dégradation du cartilage et de l'os (Kato *et al*, 2004). Les régions où la membrane est enflammée sont souvent restreintes aux régions à proximité du cartilage (Figure 5) (Lindblad *et al*, 1987). De plus, des études arthroscopiques ont démontré que les synovites, c'est-à-dire les régions dans laquelle on retrouve une inflammation de la membrane synoviale, accélèrent les réactions cataboliques endommageant le cartilage (Abramson, 2004).



© www.rheumtext.com - Hochberg et al (eds)

**Figure 5 :** Représentation d'une membrane synoviale enflammée (modifiée de Simkin *et al*, 2003).

## II.4 Le fluide synovial

Plusieurs mécanismes expliquent les caractéristiques de frottement réduit contribuant à la lubrification de l'articulation. Le fluide synovial joue un rôle très important dans la lubrification de l'articulation. Celui-ci est composé de hyaluronane ce qui donne au liquide sa propriété visqueuse. Cette substance augmente la lubrification hydrodynamique de l'articulation puisqu'il retarde le débit de chargement. Dans des conditions arthrosiques, la production du liquide synovial est augmentée. Le liquide synovial, source de nutrition pour les chondrocytes et les synoviocytes, recueille les nutriments essentiels et se débarrasse des déchets métaboliques par diffusion avec la circulation sanguine (Levick, 1984). Plusieurs protéines sont synthétisées par les synoviocytes et relâchées dans le liquide synovial telles que la lubricine, une protéine qui facilite la lubrification des couches externes de la mise en charge du cartilage. Par contre, au cours de la progression d'une maladie, d'autres protéines sont synthétisées telles que le facteur rhumatoïde IgG dans l'AR. Certaines de ces protéines sont libérées par des cellules inflammatoires ou encore mobilisées par les tissus articulaires (Wallis *et al*, 1987). L'usage continu d'une articulation enflée peut engendrer des ischémies synoviales qui entraîneraient des dommages aux tissus articulaires à cause de la relâche des radicaux libres (Stevens *et al*, 1991).

En somme, l'OA est une maladie touchant toute l'articulation dans laquelle l'ensemble des compartiments est affecté. Tous les tissus articulaires, incluant l'os



sous-chondral et le synovium, mais excluant le cartilage, sont peuplés de neurones nocicepteurs, de sorte que la sensation de douleur est chronique chez les patients OA.

### **III. Les traitements**

Les personnes diagnostiquées avec l'OA sont souvent soumises à des tests tels qu'un questionnaire et/ou une radiographie. Des études ont démontré qu'il existe une discordance entre l'articulation (souvent le genou) radiographiquement diagnostiquée et la douleur ressentie au niveau de l'articulation (Hannan *et al*, 2000). Une variété de systèmes d'évaluation ont été développés dans le but de pouvoir en quantifier la sévérité (Hart *et al*, 1995).

À ce jour, il n'existe aucun traitement curatif efficace pour traiter l'OA. Par contre, il existe plusieurs procédures qui peuvent aider à améliorer la condition médicale du patient et à mieux gérer la douleur pour ainsi mener une vie plus active et saine. Ces traitements sont donc symptomatiques.

#### ***III.1 Les analgésiques***

Plusieurs médicaments sont disponibles pour soulager les symptômes de l'OA tels que les analgésiques ou encore des agents anti-inflammatoires (The Arthritis Society). Un des analgésiques est l'acétaminophène, aussi connue sous le nom de paracétamol. Ils aident à diminuer la douleur, mais ne réduit pas l'inflammation.

Pour cette raison, les analgésiques sont souvent consommés en combinaison avec d'autres médicaments prescrits. À noter qu'une surconsommation d'acétaminophène peut causer des dommages au foie. Lorsque l'utilisation des acétaminophènes est insuffisante pour apaiser la douleur, une préparation contenant une combinaison d'acétaminophène et de codéine peut être utilisée.

### *III.2 Les anti-inflammatoires nonstéroïdiens (AINS)*

Les médicaments appelés anti-inflammatoires nonstéroïdiens (AINS) constituent une catégorie de drogues couramment prescrites pour traiter l'OA est les. Ces médicaments aident à réduire la douleur, l'enflure et la raideur de l'articulation, mais ne prévient pas la dégradation de l'articulation. À faibles doses, les AINS aident à réduire la sensation de douleur, et à des doses plus élevées, ils contribuent à soulager l'inflammation. Il existe deux types de AINS : les traditionnels tels que l'acide acétylsalicylique et l'ibuprofène, et les coxibs.

L'acide acétylsalicylique, aussi connu sous le nom courant de AAS (Aspirine<sup>®</sup>, Bayer), et l'ibuprofène (Motrin<sup>®</sup>, McNeil) sont vendus sans prescription. Ils sont reconnus en tant qu'antipyrétique, anti-inflammatoire et comme médicament analgésique. Les effets secondaires associés à l'utilisation des AINS se traduisent par des malaises gastriques, des diarrhées et des crampes abdominales. Les AINS traditionnels agissent sur l'activité des cyclo-oxygénases (COXs), enzymes responsables de la biosynthèse des prostaglandines (PGs) et des thromboxanes (TXs), inhibant ainsi les deux isoformes de la COX, la COX-1 et la COX-2. Ceci entraîne,

conséquemment, des effets secondaires indésirables puisque les AINS peuvent interagir avec les anticoagulants. Les personnes âgées atteintes d'hypertension ou éprouvant des problèmes de rein, les gens avec des antécédents d'ulcère d'estomac de même que les personnes souffrant d'insuffisance cardiaque congestive ou qui ont déjà éprouvé une attaque cardiaque ou un accident vasculaire cérébral doivent consulter leur médecin avant de consommer des AINS. D'un autre côté, une nouvelle classe d'AINS, les coxibs, c'est-à-dire les inhibiteurs spécifiques de la COX-2, ont été créés dans le but de minimiser les effets secondaires sur l'estomac en épargnant l'activité enzymatique de la COX-1, une isoforme de COX qui contribue à l'homéostasie digestive. Les coxibs sont plus connus sous le nom commercial de Vioxx<sup>®</sup> (rofécoxib, Merk Frosst) et Celebrex<sup>®</sup> (célécoxib, Pharmacia). Il est important que les personnes ayant déjà subi une crise cardiaque ou un accident vasculaire cérébral, ou éprouvé des douleurs thoraciques intenses liées à une maladie cardiaque, ne doivent prendre ni AINS classiques ni inhibiteurs de la COX-2 puisqu'ils mènent à un risque plus élevé de thrombose et de maladies cardiovasculaires (Stichtenoth *et al*, 2003).

### *III.2.1. L'aspirine*

L'aspirine, ou l'AAS, est particulièrement intéressante puisqu'elle inhibe les COXs de façon irréversible. Elle est souvent utilisée en tant qu'analgésique, antipyrétique et anti-inflammatoire. Elle possède aussi des effets anticoagulants et est employée à faibles doses à long terme pour prévenir les crises cardiaques. En effet, une utilisation à faibles doses à long terme d'aspirine inhiberait la formation de la thromboxane A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>) dans les plaquettes, ce qui produirait un effet inhibiteur sur

l'agrégation des plaquettes. Cette propriété faciliterait ainsi la circulation en prévenant la formation de caillots sanguins et justifie son utilisation dans la prévention primaire et secondaire des maladies vasculaires (Antithrombotic Trialists' Collaboration, 2002). D'ailleurs, suite à un accident cérébrovasculaire, une dose élevée d'aspirine est immédiatement administrée. De plus, une revue récente a confirmé l'usage de l'aspirine dans la prévention primaire chez les patients atteints d'hypertension puisqu'elle réduit les événements cardiovasculaires (Felmeden *et al*, 2005). Il est suggéré que les effets bénéfiques de l'aspirine sont médiés par une réduction de médiateurs inflammatoires et par une facilitation des fonctions endothéliales (Magen *et al*, 2005). Malgré tout, l'aspirine ne peut être recommandé comme un agent antihypertensif vu le manque de preuves, mais il est évident que la consommation de faibles doses d'aspirine ne soit pas nuisible à la pression artérielle et amplifierait même les fonctions endothéliales.

Plusieurs études ont aussi démontré que l'utilisation de l'aspirine pouvait s'avérer bénéfique dans certains cancers notamment celui du colon et de l'œsophage (Ulrich *et al*, 2006). En effet, puisque plusieurs conditions inflammatoires prédisposent au cancer, l'utilisation régulière de l'aspirine est associée à un risque diminué de plusieurs types de cancer (Giovannucci, 1999).

Par conséquent, une surconsommation d'aspirine, surtout à doses élevées, a pour effet des effets indésirables sur le système gastrointestinal résultant ainsi à des malaises gastriques, des diarrhées et des crampes abdominales. Aussi, dues à ces propriétés antiagrégants plaquettaires, elle peut occasionner des hémorragies.

### *III.3 Les corticostéroïdes*

Les corticostéroïdes, ou encore les « stéroïdes », constituent une option additionnelle de traitement pour réduire l'inflammation sévère et gérer la douleur. En revanche, ils ne soulagent pas la douleur. La cortisone, qui est un type de corticostéroïdes, est injectée dans l'articulation dans le but de réduire l'inflammation et l'enflure et d'améliorer la mobilité de l'articulation. L'effet d'une injection de cortisone est relativement immédiat et local, réprimant la douleur, l'œdème et l'inflammation de l'articulation. Les effets des corticostéroïdes sont plus puissants que les AINS et l'administration de ceux-ci n'est pas accompagnée des effets indésirables gastriques (MedecineNet.com, 2005). Par contre, ce traitement ne peut être utilisé à long terme, et son usage doit être utilisé seulement à une certaine fréquence puisque les corticostéroïdes peuvent affaiblir le cartilage, voire même réduire les minéraux de l'os, résultant ainsi en une fragilisation de l'articulation et des possibilités de blessures plus élevées. D'autres effets secondaires à long terme peuvent engendrer un amincissement de la peau, une sensibilité plus élevée à des hémorragies, un gain de poids, une pression artérielle plus élevée, des formations de cataractes ainsi qu'une perte osseuse, c'est-à-dire l'ostéoporose (MedicineNet.com, 2005).

### *III.4 L'exercice physique*

Une option très recommandée pour prévenir la dégradation progressive de l'articulation est, sans contredit, l'exercice physique qui aide au maintien ou même à une perte d'excès de poids. Les exercices, plus particulièrement les exercices à impact léger tels que la marche, la natation et la bicyclette stationnaire, contribuent à renforcer et tonifier les muscles qui supportent l'articulation, agissant ainsi sur la stabilité et la protection de l'articulation. L'exercice physique jumelé à une bonne attention médicale peut ainsi prévenir et retarder la dégénérescence articulaire.

### *III.5 La viscosupplémentation*

Une autre alternative assez récente au Canada est la viscosupplémentation. Ce traitement consiste à injecter une substance gélatineuse, l'acide hyaluronique, dans le genou. Cette substance est présente à l'état naturel dans le liquide synovial et le cartilage. Elle agit en tant que lubrifiant entre le cartilage. Elle est connue pour ses propriétés anti-inflammatoires en inhibant la synthèse de la PGE<sub>2</sub>, qui, elle, est associée à l'inflammation (Brandt *et al*, 2000). Cette substance stimulerait sa propre production. La viscosupplémentation contribue au rétablissement du mouvement sans friction de l'articulation apaisant ainsi la douleur et permettant une meilleure mobilité de celle-ci.

### *III.6 La prothèse*

Lorsque la dégradation articulaire est à un stade avancé ou lorsque la douleur est insupportable, il est alors possible de procéder à une intervention chirurgicale, soit pour nettoyer les débris de cartilage de l'articulation (arthroscopie), soit pour réparer ou remplacer des parties ou encore l'articulation complète par une prothèse. Cette méthode est efficace pour atténuer la douleur et maintenir ou améliorer les fonctions articulaires. Par contre, le remplacement de l'articulation possède des limitations, principalement parce que la prothèse est incapable de reproduire les propriétés mécaniques et la durabilité du cartilage articulaire, et aussi parce que la prothèse doit être fixée sur l'os du patient (Buckwalter *et al*, 2003). Cette prothèse a une durée de vie de 10 à 20 ans ce qui explique la raison pour laquelle cette alternative est utilisée en dernier recours, c'est-à-dire dans le cas d'une arthrose sévère.

### *III.7 Les approches complémentaires*

D'autres approches complémentaires pour aider à gérer l'OA sont la consommation de suppléments nutritifs tels que la chondroïtine sulfate, la glucosamine et le méthylsulfonylméthane (MSM) et la diacéine. L'acupuncture et le massage sont d'autres alternatives qui peuvent aider à soulager la douleur, mais doivent être utilisés avec précaution.

En somme, il n'existe aucun traitement curatif pour inhiber la dégradation du

cartilage et la dégénération des tissus articulaire ou encore pour réparer les tissus endommagés par l'OA. Les traitements disponibles ne font qu'aider, soit à réduire l'oedème et l'inflammation au niveau de l'articulation, ou alors à soulager la douleur associée à l'OA tout en espérant d'améliorer et de redonner une fonction satisfaisante à l'articulation.

#### **IV. Les eicosanoïdes**

Ses substances dérivées de l'acide arachidonique, les eicosanoïdes comprennent les PGs, les leucotriènes (LTs) et les TXs. Activement impliqués dans l'OA, ces molécules sont des médiateurs dont les effets varient dépendamment du tissu et du micro-environnement local (Sperling, 1995).

##### *IV.1 L'acide arachidonique*

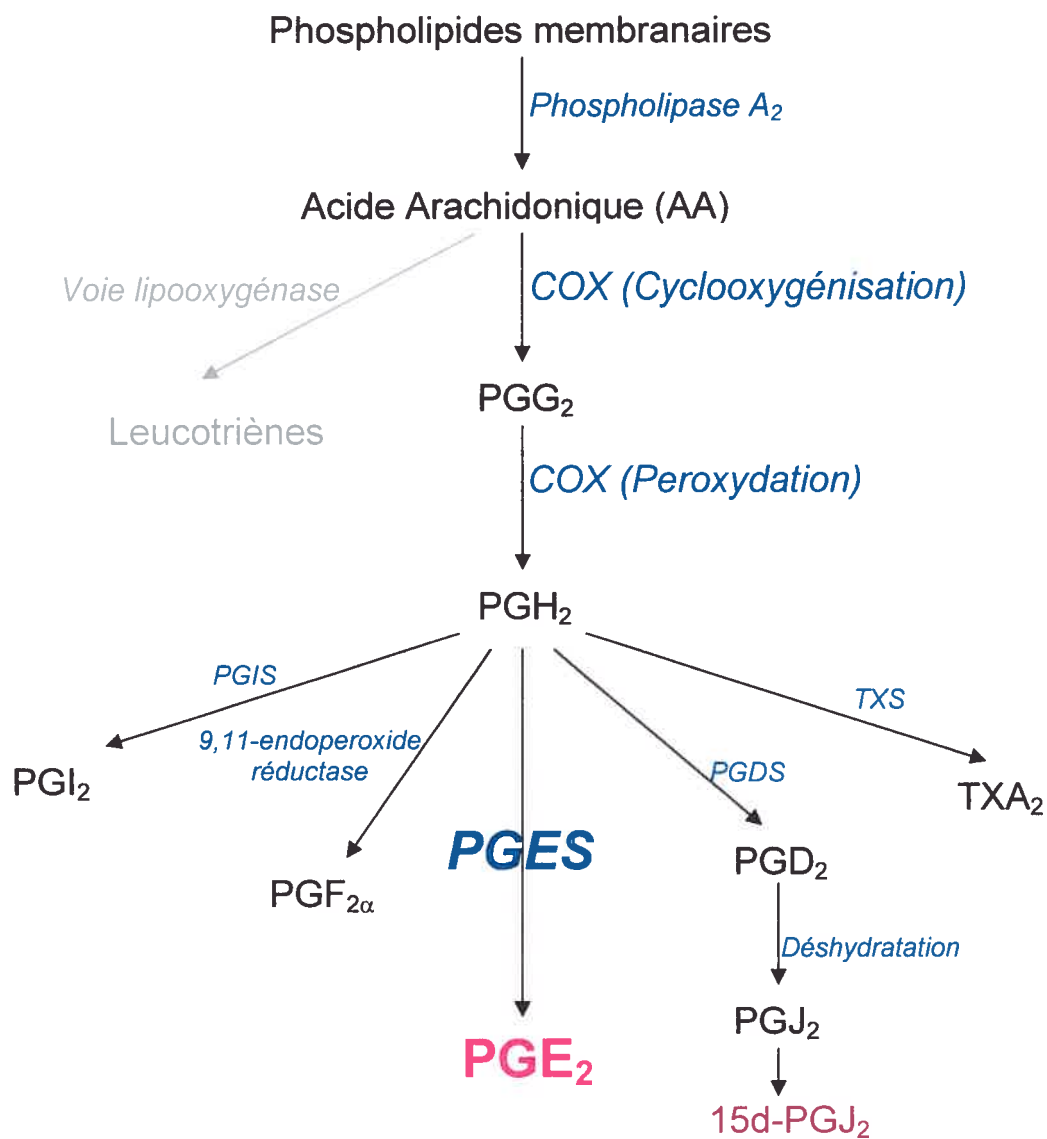
L'acide arachidonique (AA) est le point bifurquant responsable de la biosynthèse de tous les eicosanoïdes. Pour cette raison, la libération de l'AA est une étape limitante dans la biosynthèse de ces derniers. La phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) est principalement responsable de la libération de l'AA à partir de phospholipides membranaires tels que des phosphatidylinositols et des phosphatidylcholines de toutes les cellules membranaires (O'Neill, 1994). La phospholipase C<sub>2</sub> (PLC<sub>2</sub>) peut aussi libérer l'AA à partir de la membrane cellulaire. Une fois relâché, l'AA peut être oxydé et converti pour mener à la production de PGs, LTs ou de TXs. Son destin



dépend du type cellulaire, des concentrations des enzymes présentes et de l'environnement des cytokines (Oates *et al*, 2001).

#### IV.2 Les prostaglandines (PGs)

Les PGs sont des médiateurs lipidiques agissant comme des hormones locales (Thorén, 2003). Elles sont dérivées de l'AA et sont biosynthétisées par plusieurs enzymes (Figure 6). Tout d'abord, l'AA est converti par la COX en  $\text{PGH}_2$  (Smith *et al*, 2001). Cette conversion se fait en deux réactions séquentielles. Premièrement, l'AA est converti par l'activité COX de l'enzyme en  $\text{PGG}_2$ , un intermédiaire instable. Deuxièmement, ce dernier est converti rapidement par l'activité peroxidase de la COX en  $\text{PGH}_2$ . Le  $\text{PGH}_2$  est le substrat primaire pour la biosynthèse de la  $\text{PGD}_2$ , la  $\text{PGE}_2$ , la  $\text{PGF}_{2\alpha}$ , la  $\text{PGI}_2$ , et la  $\text{TXA}_2$ . Les PGs sont connues pour leurs rôles dans le contrôle de la pression artérielle, la contraction des muscles lisses et dans la médiation de l'inflammation. Les PGs sont des composés de courte durée de vie et le choix de la PG produite dépend du contexte enzymatique tissulaire. Par ailleurs, les effets biologiques des PGs dépendent de leurs interactions avec leurs récepteurs et la quantité relative de PGs produites. (Oates *et al*, 2001).



**Figure 6 :** Voies de biosynthèse des PGs à partir de l'AA.

#### IV.2.1 La prostaglandine $E_2$ ( $PGE_2$ )

Dans plusieurs types cellulaires, incluant les tissus articulaires, la  $PGE_2$  est la principale PG produite. Plusieurs études ont démontré son implication dans l'inflammation, l'apoptose, l'angiogénèse ainsi que dans plusieurs changements structuraux associés aux maladies arthritiques (Martel-Pelletier *et al*, 2003).

Les PGs, et plus particulièrement la  $PGE_2$ , sont des stimulateurs de la résorption osseuse et de la formation de l'os (Laufer, 2003). De plus, la  $PGE_2$  peut médier les réponses aux cytokines et aux facteurs de croissance. Dans les ostéoblastes OA, les niveaux d'activité métabolique sont augmentés, ce qui provoque la libération d'ostéocalcine et de phosphatase alcaline, la production de collagène et l'augmentation des niveaux de facteur de croissance analogue à l'insuline-1 (IGF-1), d'IGF-2, du facteur de croissance transformant ( $TGF-\beta$ ), de l'IL-6 et de la synthèse de la  $PGE_2$  (Laufer, 2003). De plus, la  $PGE_2$  entraîne la mort des chondrocytes induite au monoxyde d'azote (NO), ce qui contribuerait à la progression de l'OA (Notoya *et al*, 2000).

Il existe quatre récepteurs de la  $PGE_2$  nommés  $EP_1$ ,  $EP_2$ ,  $EP_3$  et  $EP_4$ . Ces récepteurs sont des GPCR (récepteurs couplés à la protéine G) transmembranaires et médient l'activité des PGs. Les récepteurs  $EP_2$  et  $EP_4$  sont aussi référés comme étant des récepteurs « relaxants » puisqu'ils utilisent des signaux intracellulaires par  $G_s$  ( $G$  stimulateur) causant une augmentation de l'adénosine monophosphate cyclique (AMPc). Ils sont exprimés dans les macrophages qui eux-même produisent un taux élevé de  $PGE_2$  lorsqu'ils sont stimulés par des stimuli pro-inflammatoires. De plus, la stimulation de ces récepteurs inhibe la libération des cytokines, suggérant une rétro-

inhibition des récepteurs (Sugimoto *et al*, 2000). Par ailleurs, les souris déficientes en EP<sub>4</sub> n'ont pas de résorption osseuse d'ostéoclastes, ce qui illustre ainsi le rôle inflammatoire de ce récepteur (Sakuma *et al*, 2000). Le récepteur EP<sub>1</sub> provoque une augmentation intracellulaire de calcium par le G<sub>q</sub> (G ubiquitaire) et se réfère ainsi comme étant un récepteur « contractile » (Sugimoto *et al*, 2000). Le récepteur EP<sub>3</sub>, quant à lui, se nomme aussi le récepteur « inhibiteur » puisqu'il se couple à G<sub>i</sub> (G inhibiteur) et réduit la formation d'AMPC (Bhattacharya *et al*, 1999). Des études effectuées sur des souris déficientes de ces récepteurs ont démontré que ces récepteurs sont impliqués dans plusieurs conditions pathologiques (Thorén, 2003).

#### IV.3 Les cyclo-oxygénases (COX)

Les COXs sont aussi appelées prostaglandines endoperoxydes synthases ou prostaglandines H synthases (PGHS). Ce sont des bis-oxygénases dépendantes de l'hème et des peroxydases. La COX catalyse l'AA à l'aide de deux molécules d'O<sub>2</sub>, pour former l'endoperoxyde PGG<sub>2</sub>. La PGG<sub>2</sub> est ensuite réduite par l'activité peroxydase (POX) de la COX et convertie en PGH<sub>2</sub> (Smith *et al*, 2000). Jusqu'à aujourd'hui, trois isoformes de la COX ont été identifiées : la COX-1 (PGHS-1), la COX-2 (PGHS-2) et la COX-3. La COX-1 et la COX-2 sont dérivées de deux gènes différents. Les deux COXs sont situées dans le lumen du réticulum endoplasmique et dans la membrane nucléaire (Liou *et al*, 2000; Liou *et al*, 2001). La COX-3, quant à elle, serait un produit d'un épissage alternatif du gène de la COX-1 (Berembaum, 2004).

#### IV.3.1 COX-1

La COX-1 est exprimée de manière constitutive dans plusieurs tissus et cellules de mammifères. Elle joue alors un rôle dans l'homéostasie de ces tissus (Smith *et al*, 2000). Son rôle est particulièrement important dans la cytoprotection gastrique, l'équilibre hydrique rénal et l'agrégation de plaquettes (Oates *et al*, 2001). Le gène de la COX-1 est d'environ 22 kb en longueur et possède 11 exons (Tableau I). Il possède peu d'éléments de réponse en cis et aucune boîte TATA en 5' du gène, ce qui est consistant à la description d'un gène domestique (Figure 7) (Kraemer *et al*, 1992). Par contre, certaines études ont indiqué que la COX-1 pouvait être inducible dans certains systèmes tels que dans les cellules endothéliales (Bryant *et al*, 1998). Cette isoforme est principalement située dans le réticulum endoplasmique et la membrane nucléaire. En outre, dans un milieu sans sérum, les cellules endothéliales de bovin n'expriment que la COX-1. Un traitement de ces cellules avec un ionophore de calcium n'induit aucune production de PGs indiquant ainsi que la COX-1 est incapable de synthétiser des PGs à partir d'AA libéré de manière endogène, mais principalement de manière exogène (Morita, 2002).

Des souris déficientes en COX-1 ont démontré une agrégation de plaquettes réduite et une inflammation diminuée induite par l'AA. Ceci témoigne que les plaquettes n'expriment que la COX-1 et que des concentrations élevées d'AA sont convertis en PGs par la COX-1 (Lagenbach *et al*, 1995).

### IV.3.2 COX-2

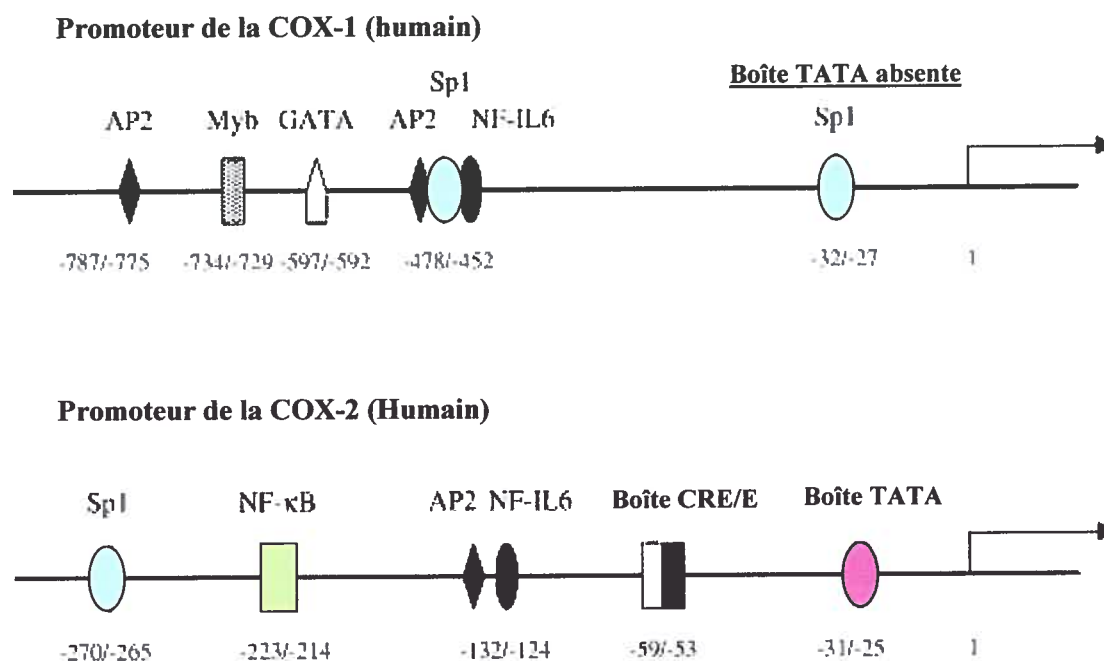
La découverte de la COX-2 dans le début des années 1990 marque un tournant dans la conquête des effets des PGs et des AINS (Berembaum, 2004). Cette isoforme de la COX est inductible et est généralement présente en très faibles quantités dans les fibroblastes, les cellules endothéliales et les macrophages. Elle peut être stimulée par des cytokines, des facteurs de croissance, ou encore des stress mécaniques (Chandrasekharan *et al*, 2004; Morita, 2002). En d'autres termes, elle est inductible durant les réactions inflammatoires. La biosynthèse des PGs tardive, qui, après un certain temps, s'effectue suite à une stimulation pro-inflammatoire, est accompagnée d'une induction *de novo* de la COX-2, indépendamment de la présence de la COX-1 (Murakami *et al*, 1999). Contrairement à la COX-1, la COX-2 métabolise mieux les niveaux relativement bas de l'AA en PGH<sub>2</sub>, ce qui explique la préférence de la COX-2 par rapport à la COX-1 lors des réponses tardives (Murakami *et al*, 1999).

Elle est impliquée dans plusieurs fonctions biologiques telles que la désagrégation des plaquettes, la vasodilatation, la résorption osseuse et plusieurs autres événements pathologiques. Le gène de la COX-2 est d'environ 8,3 kb de longueur avec 10 exons (Tableau I). Par opposition à la COX-1, le gène de la COX-2 possède plusieurs éléments de réponse en amont (Figure 7). Parmi ces nombreux éléments de réponse, se trouvent deux sites de liaison NF-κB (facteur de transcription nucléaire κB), un Sp1, un NF-IL6 (facteur nucléaire-interleukine 6) et un CRE (élément de réponse de l'AMPc). Ces éléments de réponse sont activés et augmentent l'expression de la COX-2 dans les conditions inductibles. D'autre part, l'expression

de la COX-2 est diminuée par la présence de glucocorticoïdes et de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-4 et l'IL-10 (Niino *et al*, 1997).

	COX-1	COX-2
<b>Locus</b>	9q32-q33.3	1q25.2-q25.3
<b>Grandeur du gène</b>	22 kb	8,3 kb
<b>Nombre d'exon</b>	11	10
<b>Grandeur de l'ARNm</b>	2,8 kb	4,6 kb
<b>Nucléotides codant</b>	1797 bp	1812 bp
<b>Nombre d'acides aminés</b>	576 aa	604 aa
<b>5' - région flanquante</b>	Boîte TATA absente, riche en GC, Sp1	NF-κB, NF-IL6, CRE, Boîte E, Boîte TATA
<b>3' - région non-traduite</b>	0,7 kb	Élément riche en AUUUA, 2 kb
<b>Expression</b>	Constitutive	Inductible

**Tableau I :** Comparaison des principales caractéristiques de la COX-1 et de la COX-2 (d'après Tanabe *et al*, 2002).



**Figure 7 :** Représentation des éléments régulateurs dans les promoteurs humains des gènes de la COX-1 et de la COX-2 (modifiée de Tanabe *et al*, 2002).

Le site actif de la COX-2 est plus petit que celui de la COX-1 et la découverte de cette différence a permis au développement d'inhibiteurs spécifiques de la COX-2 (Morita, 2002). Des études d'imagerie fluorescente par microscopie confocale et d'histofluorescence ont décelé la COX-2, tout comme la COX-1, dans le réticulum endoplasmique, mais à des concentrations beaucoup plus élevées que dans la membrane nucléaire (Morita *et al*, 1995).

Les souris déficientes en COX-2 présentent des changements phénotypiques plus sévères que les souris déficientes en COX-1. Les souris femelles déficientes en COX-2 exhibent des altérations touchant les fonctions du système de reproduction (Morham *et al*, 1995; Dinchuk *et al*, 1995). Les souris déficientes en COX-2 ont une incidence réduite de blessure au cerveau, de même qu'une suppression de tumorigénèse. D'autres changements phénotypiques observés chez les souris déficientes en COX-2 sont des néphropathies rénales, des fibroses cardiaques, des péritonites, et des échecs à la fermeture du canal artériel (Cheng *et al*, 2001; Laenbach *et al*, 1999).

Lorsqu'il y a inflammation, les niveaux d'ARNm, de protéines et d'activité de la COX-1 restent inchangés. Contrairement à la COX-2, ses niveaux d'expression et d'activité augmentent de manière drastique, et par le fait même, les niveaux de production de PGs augmentent aussi. Par ailleurs, lorsque des inhibiteurs de la COX-2 sont administrés, il y a réduction des niveaux de production de PGs et diminution de l'inflammation de manière significative. Ceci indique que la COX-2 est impliquée dans l'inflammation, tandis que la COX-1 ne l'est pas. Le gène de la COX-2 est



sensible aux médiateurs inflammatoires tels que l'IL-1 $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et le LPS (lipopolysaccharide), ce qui illustre son rôle dans l'inflammation. Les inhibiteurs de la COX-2 sont donc utilisés pour traiter plusieurs conditions pathologiques dans lesquelles des symptômes d'inflammation se manifestent tels que l'OA, l'AR et la douleur musculosquelettique (Morita, 2002).

Des études *in vivo* ont démontré que les inhibiteurs de la COX-2 réduisent la biosynthèse de la PGE<sub>2</sub> de manière significative plus que tout autre PG (Harada *et al*, 1996).

#### IV.3.3 COX-3

Dans le début du XXI<sup>e</sup> siècle, une troisième COX a été découverte dans le cortex cérébral chez le chien. Cette isoforme est une variante de la COX-1 (vCOX-1), aussi appelé COX-3. Cependant, cette variante n'est pas le produit d'un autre gène, mais plutôt le produit d'un épissage alternatif du gène de la COX-1 (Berembaum, 2004). L'intron 1 du gène de la COX-1 est retenu et un produit plus long que la COX-2 est obtenu. Celle-ci serait exprimée préférentiellement dans le cerveau et dans le coeur (Chandrasekharan *et al*, 2002; Shafteel *et al*, 2003).

Durant la réaction inflammatoire, une grande quantité de PGE<sub>2</sub> est libérée. Lorsque des inhibiteurs de la COX-2 sont administrés, la production de PGE<sub>2</sub> est arrêtée et l'inflammation est résolue. En revanche, après un laps de temps, lorsque la réaction inflammatoire est résolue, la production de la PGD<sub>2</sub> est augmentée tandis que celle de la PGE<sub>2</sub> est arrêtée (Gilroy *et al*, 1999). Certains croient que cette production tardive de PGD<sub>2</sub> est le résultat de l'activité de la COX-3 (Berembaum,

2004), ce qui pourrait éclaircir plusieurs aspects comme par exemple, expliquer les mécanismes par lesquels l'acétaminophène exerce un effet analgésique et antipyrétique. Par contre, aucune évidence jusqu'à maintenant n'a pu supporter cette hypothèse. La présence de l'expression de la COX-3 chez l'humain et son implication dans l'OA reste encore à être prouvée.

En plus de la COX-3, toujours chez le chien, deux autres variantes plus courtes de la COX, ne possédant pas d'activité cyclo-oxygénase, ont été identifiées, la PCOX-1 et la PCOX-1b (Chandrasekharan et al, 2002). Leurs fonctions restent encore à être élucidées.

#### *IV.4 Les PGE Synthases (PGES)*

La PGE synthase (PGES) (EC 5.3.99.3) catalyse spécifiquement la conversion de la PGH<sub>2</sub> en PGE<sub>2</sub>. Il a été démontré que les PGES sont impliquées dans la douleur, l'inflammation, la fièvre, la tumorigénèse, l'ovulation et la fertilisation, le métabolisme osseux, la maladie d'Alzheimer et d'autres processus physiologiques et/ou pathologiques (Murakami *et al*, 2002).

Cette enzyme est membre de la superfamille des MAPEG (membrane-associated proteins involved in eicosanoid and glutathione metabolism) et se nommait autrefois la MGST1-L1 (Glutathione-S-Transferase-1-like-1 microsomale) puisque ce gène était homologue à la MGST1 à environ 40 % et ses fonctions étaient encore inconnues (Jakobsson *et al*, 1999). Cette MGST1-L1 est maintenant nommée mPGES-1. La superfamille des MAPEG comprend la MGST-1, -2, -3, la FLAP

(5-lipoxygenase-activating protein) et la LTCS (leukotriene C<sub>4</sub> synthase). Cette famille comprend généralement des protéines essentielles au métabolisme lipidique et pour la détoxification des substances toxiques exogènes (Naraba *et al*, 2002).

Il existe trois isoformes de PGES; une PGES cytosolique (cPGES), et deux PGES membranaires (mPGES) nommées mPGES-1 et mPGES-2.

#### *IV.4.1 cPGES*

La cPGES est identique à la protéine p23, une protéine associée à la protéine de choc thermique 90 (Hsp-90). Autrefois, elle était référée par le nom PIG12 (Thorén *et al*, 2003). Cette enzyme requiert la GSH et elle est indifférente aux stimuli pro-inflammatoires, excepté dans le cerveau du rat, où elle est induite par le LPS (Tanioka *et al*, 2000). Elle est exprimée de manière constitutive dans plusieurs tissus et cellules (Tableau II). Des études de cotransfection ont démontré que la cPGES et la COX-1 sont fonctionnellement liées et associées dans le maintien de l'homéostasie des tissus. De plus, son activité est couplée à celle de la COX-1 et elle réaliserait préférentiellement l'isomérisation de la PGH<sub>2</sub> générée par la COX-1 pour la production immédiate de la PGE<sub>2</sub> (Tanioka *et al*, 2000).

Enzymes	mPGES-1	mPGES-2	cPGES
Propriétés structurelles	famille MAPEG	domaine homologue à la thioredoxine	Hsp90 cochaperone p23
Expression	inductible	constitutive	constitutive
Localisation cellulaire	membrane périnucléaire	Golgi, cytosole	cytosole
Préférence de COX	COX-2	COX-1, COX-2	COX-1
Fonctions <i>in vivo</i>	inflammation, douleur, fièvre, cancer	inconnues	inconnues

**Tableau II :** Comparaison des propriétés des PGES (modifié de Kudo *et al*, 2005).

#### IV.4.2 mPGES-1

Comme il a été mentionné auparavant, la mPGES-1 était nommée à l'origine la MGST1-L1. Son gène est situé sur le chromosome humain 9q34.4. La mPGES-1 possède une activité peroxydase dépendante et une activité glutathione transférase, mais ces deux niveaux d'activité sont relativement faibles comparés à celle de la PGES puisque la catalyse de la PGE<sub>2</sub> est la réaction principale et celle dont l'activité est obtenue le plus rapidement (Thorén *et al*, 2003).

##### IV.4.2.1 Niveau basal de l'expression de la mPGES-1

La mPGES-1 est généralement exprimée chez l'humain dans la plupart des tissus à des niveaux relativement bas. Par contre, son expression est inductible par plusieurs cytokines, facteurs de croissance, LPS et par des promoteurs de tumeurs,

indiquant que son activité est couplée à celle de la COX-2 inductible (Tableau II) (Murakami *et al*, 2000; Mancini *et al*, 2001; Stichtenoth *et al*, 2001). La mPGES-1, en tandem avec la COX-2, est induite par la cytokine pro-inflammatoire IL-1 $\beta$  et est responsable de la production de la PGE<sub>2</sub> associée à des réactions inflammatoires, notamment la douleur inflammatoire (Kamei *et al*, 2004).

#### IV.4.2.2 Régulation de l'expression de la mPGES-1

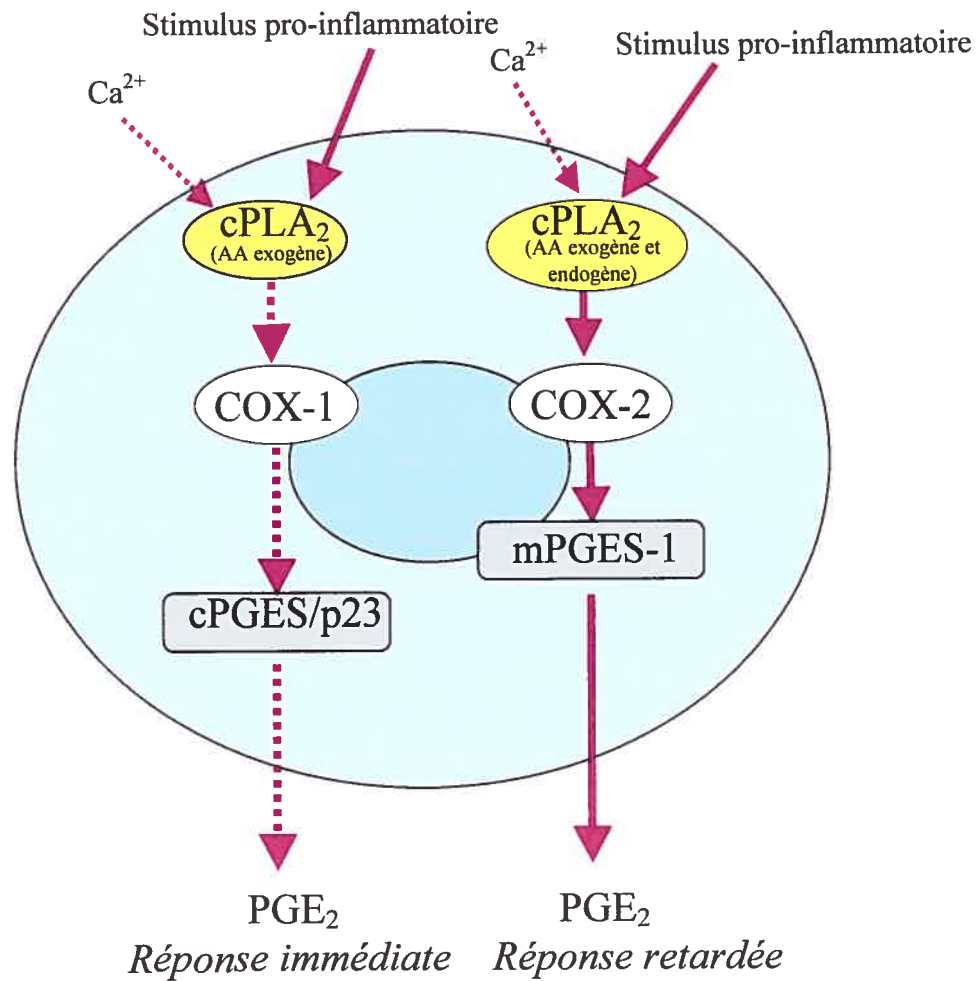
La mPGES-1 est présente dans les cellules activées durant l'inflammation telles que les synoviocytes. Dans plusieurs types cellulaires, il a été démontré que la production de la PGE<sub>2</sub> est élevée suite à un traitement avec des cytokines, notamment dans les synoviocytes et les cellules vasculaires de muscles lisses (Kojima *et al*, 2003; Belvisi *et al*, 1997). L'induction de la mPGES-1, suite à ces traitements, suit la surexpression de la COX-2 pour générer ce niveau plus élevé de PGE<sub>2</sub> (Jakobsson *et al*, 1999; Murakami *et al*, 2000; Mancini *et al*, 2001; Thorén *et al*, 2000; Soler *et al*, 2001; Stichtenoth *et al*, 2001, Kojima *et al*, 2002; Giannico *et al*, 2005). Les glucocorticoïdes sont renommés pour exercer des propriétés anti-inflammatoires. Conformément à cet effet, l'expression de la mPGES-1 induite par des cytokines est réprimée par le dexaméthasone dans la lignée cellulaire A549, une lignée de cellules épithéliales pulmonaires ainsi que dans les macrophages et synoviocytes, tout comme l'expression de la COX-2 et la synthèse de PGE<sub>2</sub> le sont (Murakami *et al*, 2000, Stichtenoth *et al*, 2001). De plus, la mPGES-1 et la COX-2 sont coexprimés dans plusieurs maladies et conditions pathologiques, notamment la douleur, la fièvre, l'inflammation, le cancer et la maladie d'Alzheimer. Ceci met en relief le lien qui

existe entre ces deux enzymes pour atteindre une production efficiente de PGs (Thorén, 2003).

#### *IV.4.2.3 Fonctionnement couplé de la mPGES-1 et de la COX-2*

Il existe de nombreuses preuves illustrant la coordination de l'induction de la mPGES-1 avec celle de la COX-2, prouvant ainsi la dimension associative de leurs rôles. Des études de cotransfection avec la mPGES-1 et la COX-2 indiquent que la production de la PGE<sub>2</sub> est augmentée de manière considérable comparé à lorsque la mPGES-1 ou la COX-2 sont exprimées seules (Murakami *et al*, 2000). De plus, la mPGES-1 et la COX-2 sont colocalisées dans le réticulum endoplasmique et dans la membrane périnucléaire (Figure 8) (Murakami *et al*, 2000). Néanmoins, les mécanismes de régulation du gène de la mPGES-1 et celui de la COX-2 ne sont pas effectués de la même manière puisque le promoteur de la mPGES-1 ne possède pas de site de liaison pour NF- $\kappa$ B, CRE, ou encore une boîte E, qui sont tous présents dans le promoteur du gène de la COX-2. Malgré tout, une étude a démontré que l'expression de la mPGES-1 induite par l'IL-1 $\beta$  impliquerait le facteur NF- $\kappa$ B (Catley *et al*, 2003). De plus, la région en 3' de la mPGES-1 ne possède pas la séquence d'instabilité AUUUA que la COX-2 possède. Également, l'expression induite de la mPGES-1 est hautement régulée et dépend du facteur de réponse de croissance précoce (Egr-1), un facteur de transcription (Naraba *et al*, 2002; Subbaramaiah *et al*, 2004). L'expression induite de la mPGES-1 est régulée par une voie des MAP kinase (mitogen-activated protein kinase), évoquant ainsi que la mPGES-1 et la COX-2 peuvent être induites par les mêmes stimuli, mais qu'elles

utilisent différentes voies de signalisation (Rolli *et al*, 1999; Kawao *et al*, 2005).



**Figure 8 :** Représentation de la fonction couplée et de la localisation entre les COXs et les PGES (adaptée de Murakami *et al*, 2000).

#### IV.4.2.4 Structure du gène de la mPGES-1

Le gène humain de la mPGES-1 s'étend sur ~15 kb et est divisé en trois exons. Le promoteur de la mPGES-1 est riche en GC et ne possède pas de boîte

TATA. Il contient plusieurs sites de liaison potentiels pour les facteurs de transcription tels que deux boîtes GC, deux boîtes en tandem Barbie et un élément de réponse aryle d'hydrocarbure (Forsberg *et al*, 2000). De plus, des études ont démontré que les boîtes GC sont cruciales pour l'activation du promoteur. La boîte GC proximale ou la boîte GC 2 se trouve à être le site de liaison pour le facteur de transcription Egr-1. L'activité de liaison d'Egr-1 pour la boîte GC augmente lorsqu'il y a stimulation avec la LPS, l'IL-1 $\beta$ , ou le TNF- $\alpha$  ou l'ester de phorbol (Naraba *et al*, 2002; Subbaramaiah *et al*, 2004). Le promoteur de la mPGES-1 est transcriptionnellement activé en présence d'IL-1 $\beta$  et diminué en présence de phénobarbital par l'induction ou la répression de la liaison d'Egr-1, respectivement, à son site sur le promoteur de la mPGES-1 (Forsberg *et al*, 2000). Néanmoins, les deux boîtes GC sont essentielles pour un bon fonctionnement du promoteur de la mPGES-1 (Naraba *et al*, 2002; Subbaramaiah *et al*, 2004). Par ailleurs, l'implication des éléments et des facteurs de transcription en *cis* dans l'activation du promoteur de la mPGES-1 n'est pas encore claire.

#### IV.4.2.5 Inhibition de la mPGES-1

Dans le but d'inhiber la synthèse de la PGE<sub>2</sub>, des équipes ont étudié les effets des AINS sur l'activité de la mPGES-1. La mPGES-1 est inhibée par la leukotriène C<sub>4</sub> (LTC<sub>4</sub>), par un des inhibiteurs spécifiques de la COX-2, le NS-398, et par le sulindac sulfide à des CI<sub>50</sub> de 5, 20 et 80  $\mu$ M, respectivement (Thorén *et al*, 2000). Le MK-866, un inhibiteur de la FLAP, inhibe aussi l'activité de la mPGES-1 avec une CI<sub>50</sub> de 3  $\mu$ M, possiblement en se liant dans la région de liaison de l'AA que la



FLAP, la LTCS et la mPGES-1 possèdent communément (Mancini *et al*, 1998; Mancini *et al*, 2001). Par ailleurs, une autre étude a montré que l'effet inhibiteur était renversé avec l'addition de la PGE<sub>2</sub> exogène dans lesquelles l'indométhacine, le NS-398, le rofécoxib ou le méloxicam sur l'expression de la mPGES-1 induite par l'IL-1 $\beta$ . Ceci révèle que la PGE<sub>2</sub> participe à un rétrocontrôle positif sur l'induction de la mPGES-1 (Kojima *et al*, 2003). D'autres composés tels que la 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>), l'AA, l'acide docosahexanoïde (DHA) et l'acide eicopentaenoïque (EPA) ont démontré une inhibition sur la mPGES-1 avec des CI<sub>50</sub> semblables (Quraishi *et al*, 2002). D'autre part, l'activité de la mPGES-1 n'est pas inhibée par le 1-chloro-2,4-dinitrobenzène (CDNB), un substrat commun pour les GST, contrairement à la cPGES (Tanioka *et al*, 2000).

#### IV.4.2.6 La mPGES-1 dans les tissus articulaires (OA, AR et normaux)

La mPGES-1 est spécialement intéressante dans les maladies arthritiques puisque son métabolite, la PGE<sub>2</sub>, est le principal médiateur de l'inflammation et des réponses de douleur associées à l'inflammation dans les maladies arthritiques, plus particulièrement l'OA (Narumiya *et al*, 1999; Portanova *et al*, 1996). Comme de fait, la PLA<sub>2</sub>, le précurseur dans la biosynthèse des prostanoïdes, est plus présente dans le liquide synovial arthritique que normal (Stichtenoth *et al*, 2001). Les ARNm de la cPGES et de la mPGES-1 sont tous deux présents dans les synoviocytes, mais seul celui de la mPGES-1 peut être régulé. De même, les niveaux d'activité de PGES sont significativement plus bas dans la fraction cytosolique que microsomale, confirmant ainsi le rôle de la mPGES-1 dans la synthèse de la PGE<sub>2</sub> (Stichtenoth *et al*, 2001).

Les niveaux libérés de la  $PGE_2$  sont 50 fois plus élevés dans un cartilage OA que dans un cartilage normal. Effectivement, lorsqu'un cartilage normal est placé dans des conditions pro-inflammatoires, les niveaux détectés de la  $PGE_2$  sont de 18 fois plus élevés (Martel-Pelletier *et al*, 2003). La  $PGE_2$  induit la dégradation du cartilage en inhibant la synthèse du collagène et en stimulant la production des MMPs (O'Keefe *et al*, 1992; Zahner *et al*, 1997). Ainsi, l'expression de la mPGES-1 est détectée de manière clairement plus élevée dans le cartilage et les chondrocytes humains OA que chez le cartilage et les chondrocytes normaux (Masuko-Hongo *et al*, 2004). De manière étonnante, la  $PGE_2$  a un effet amplificateur sur l'expression de la mPGES-1 stimulée par l'IL-1 $\beta$  dans les synoviocytes arthritiques (Kojima *et al*, 2003). Les effets inhibiteurs des coxibs sur l'expression de la mPGES-1 sont renversés lors de l'addition de  $PGE_2$  exogène, ce qui supporte l'aptitude des effets amplificateurs de la  $PGE_2$ . Cette accentuation de l'expression de la mPGES-1 par la  $PGE_2$  est accompagnée d'une augmentation de l'AMPc, par les récepteurs EP<sub>2</sub> et EP<sub>4</sub> (Kojima *et al*, 2003). En fait, le rôle de la  $PGE_2$  est double puisqu'elle est capable de diminuer la régulation de la cytokine pro-inflammatoire TNF- $\alpha$  et qu'elle peut aussi augmenter celle de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 (Shinomiya *et al*, 2001). D'une autre part, la  $PGE_2$  peut inhiber l'apoptose des lymphocytes T (Goetzl *et al*, 1995).

La mPGES-1, tout comme la COX-2, est pratiquement non détectable dans des conditions non stimulées. Toutefois, son expression, suivant celle de la COX-2 et celle de la PLA<sub>2</sub>-IIA, est significativement élevée dans les synoviocytes des patients atteints d'AR (Murakami *et al*, 2003).

La mPGES-1 a été détectée dans les cellules synoviales intimes AR

seulement dans un état actif. Quant à la mPGES-2, elle est retrouvée dans des états actifs et inactifs dans les tissus synoviaux intimaux et dans les tissus sous-intimaux (Murakami *et al*, 2003). Ceci concorde avec une autre étude où la COX-2 a été localisée dans les synoviocytes, l'endothélium des vaisseaux sanguins, les chondrocytes et les fibroblastes AR, tandis que la COX-1 a été retrouvée dans les synoviocytes prélevés de patients normaux (Siegle *et al*, 1998).

Outre cela, une étude récente a démontré la contribution des MAPK dans l'expression de la mPGES-1 stimulée par l'IL-1 $\beta$  dans la lignée cellulaire de chondrocytes humains immortalisés, T/C-28a2, et dans les chondrocytes humains OA (Masuko-Hongo *et al*, 2004). L'étude démontre le rôle des MAPK ERK1/2 et p38 dans l'induction de l'expression de la mPGES-1 par l'IL-1 $\beta$  chez les chondrocytes OA. Des inhibiteurs de la p38 et de ERK, SB203580 et PD98059, respectivement, restreignent la stimulation de l'expression de l'ARNm et de la protéine de la mPGES-1 par l'IL-1 $\beta$ . Plus particulièrement, l'inhibition d'ERK1/2 n'a pas affecté la stimulation de l'ARNm de la COX-2 par l'IL-1 $\beta$ , mais plutôt, a diminué l'effet de l'IL-1 $\beta$  sur l'ARNm de la mPGES-1. Cependant, un des inhibiteurs qui bloque l'activité de l'isoforme  $\alpha$  de la p38 MAPK, le SC-906, n'a pas réprimé l'induction de la mPGES-1 par l'IL-1 $\beta$  chez les chondrocytes OA. Ceci suggère que le mécanisme par lequel la mPGES-1 est activée ainsi que la biosynthèse de la PGE<sub>2</sub>, dépendent des activités des MAPK ERK et p38, et d'une manière préférentielle à la MAPK p38 $\beta$ , chez les chondrocytes humains stimulés par l'IL-1 $\beta$ .

#### IV.4.2.7 Modèles animaux de la mPGES-1

Des études impliquant des souris déficientes pour la mPGES-1 ont démontré que la mPGES-1 est responsable de la production induite par le LPS de la PGE<sub>2</sub>. En effet, le niveau de production de la PGE<sub>2</sub> chez les souris mutantes pour la mPGES-1 est comparable à celui des souris de type sauvage (Uematsu *et al*, 2002). De plus, ces souris mutantes produisent un niveau normal de cytokines inflammatoires suite à une stimulation par le LPS. Ceci indique que l'expression de la PGE<sub>2</sub> endogène n'est pas essentielle dans la régulation de la production de cytokines pro-inflammatoires. Les souris déficientes pour la mPGES-1 ne démontrent aucun changement phénotypique dans leurs organes et dans leurs fonctions vitales, confirmant qu'une autre isoforme de PGES non inductible se substituerait à la mPGES-1 dans les conditions normales (Trebino *et al*, 2003). Également, lorsque l'arthrite est induite au collagène chez ces souris, elles manifestent une réduction importante dans leurs réponses inflammatoires comparées aux souris de type sauvage. Ces études suggèrent que la mPGES-1 est responsable de la douleur inflammatoire et des réponses inflammatoires associées à l'hypersensibilité de type tardif, illustrant ainsi son rôle dans l'inflammation aiguë et chronique.

Dans un modèle d'arthrite à l'adjuvant chez le rat, un modèle impliquant l'inflammation de l'articulation, il a été démontré que la mPGES-1 est coinduite avec la COX-2 et l'IL-1 $\beta$  et son induction la plus forte se manifeste dans la patte traitée à l'adjuvant (Mancini *et al*, 2001). Loin de là, les expressions des protéines de la cPGES/p23, la COX-1 et de la mPGES-2 sont induites de manière non significative lorsqu'elles sont comparées à l'augmentation de 50 à 80 fois de la mPGES-1 qui était

accompagnée d'une augmentation de production de la  $PGE_2$  (Claveau *et al*, 2003). Ceci confirme le rôle prédominant de la mPGES-1 dans l'inflammation des tissus articulaires.

#### IV.4.3 mPGES-2

Plusieurs études ont identifié une PGES membranaire indépendante de GSH dans le cœur chez le bovin (Watanabe *et al*, 1999), et dans la rate et l'utérus chez le rat (Watanabe *et al*, 1997). La protéine correspondante a été exprimée et purifiée chez le singe et cette protéine est maintenant référée comme étant la mPGES-2 (Tanikawa *et al*, 2002). Le gène humain de la mPGES-2 est situé sur le chromosome 9q33-a34 à proximité du gène de la COX-1, de la mPGES-1 et de la PGDS de type lipocaline (Takinawa *et al*, 2002). La mPGES-2 est localisée dans le cytosol avec une forte préférence dans la région périnucléaire (Murakami *et al*, 2003).

Des études de transfection ont affirmé que la mPGES-2 est responsable de la production de la  $PGE_2$  dans les réponses immédiates et tardives, et est fonctionnellement couplée à la COX-1 et la COX-2. D'ailleurs, l'expression de cette isoforme n'est pas induite par l'inflammation tissulaire et se montre plutôt constitutive (Murakami *et al*, 2003). Par contre, son expression s'est retrouvée augmentée dans le cancer colorectal humain. Ses fonctions exactes et son rôle dans les différentes physiopathologies restent énigmatiques à ce jour.

#### IV.4.4 Autres PGES

Deux autres GSH-S-transférases cytosoliques de la classe Mu ont été purifiées du cortex cervical humain et démontrent des activités de PGES qui sont GSH-dépendantes. Ces deux enzymes, GSTM2-2 ( $\mu 2$ ) et GSTM3-3 ( $\mu 3$ ), catalysent l'isomérisation de la  $\text{PGH}_2$  en  $\text{PGE}_2$  *in vitro* (Beuckmann *et al*, 2000). Par contre, leurs fonctions et leurs rôles restent encore à être déterminés.

### V. Peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR)

Les récepteurs nucléaires activés par les ligands sont parmi les facteurs de transcription les plus étudiés puisqu'ils jouent un rôle important dans la régulation de nombreux événements tels que le développement, l'homéostasie, le métabolisme, la reproduction, les fonctions vasculaires et l'inflammation (Robinson-Revachi *et al*, 2003; Staels *et al*, 2005). Parmi ces récepteurs nucléaires, se trouve un récepteur nucléaire hormonal, le récepteur des activateurs de proliférateur de peroxyosome (PPAR). Ces récepteurs sont activés par de petites molécules lipophiles dont les hormones et les vitamines dérivées directement ou indirectement des précurseurs diététiques.

#### V.1 Les classes de PPAR

Les PPARs étaient à l'origine considérés comme des récepteurs orphelins puisque les ligands étaient inconnus. Par la suite, les drogues thiazolidinediones

(TZDs) antidiabétiques ont été identifiées comme étant des ligands des PPARs. Il existe trois isoformes de PPARs : PPAR $\alpha$  (NR1C1), PPAR  $\beta/\delta$  (aussi nommé NUC-1 ou FAAR, dépendamment de l'espèce et du tissu dans lequel il a été cloné), et PPAR $\gamma$  (NR1C3) (Diradourian *et al*, 2005). PPAR $\alpha$  est impliqué dans la régulation du catabolisme mitochondrial des acides gras tandis que PPAR $\beta/\delta$  est impliqué dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras des muscles squelettiques (Tanaka *et al*, 2003). L'expression de PPAR $\gamma$  a été pendant longtemps observée seulement dans les tissus adipeux et on croyait que sa fonction ne se limitait qu'à la régulation du métabolisme lipidique et glucidique. Cependant, il s'est avéré que PPAR $\gamma$  est aussi exprimé dans les cellules immunitaires telles que les cellules B et les cellules T, de même que dans les macrophages, les synoviocytes, les chondrocytes et les cellules mésangiales, (Harris *et al*, 2000; Padilla *et al*, 2000; Asano *et al*, 2000; Chinetti *et al*, 1998; Kawahito *et al*, 2000; Boyault *et al*, 2001).

PPAR $\gamma$  est lui-même catégorisé en quatre isoformes puisque l'épissage alternatif de son promoteur génère quatre transcrits :  $\gamma 1$ ,  $\gamma 2$ ,  $\gamma 3$  et  $\gamma 4$ . PPAR $\gamma 1$  est distribué de manière ubiquitaire à des taux de concentration plus élevés dans les tissus adipeux et dans les macrophages (Diradourian *et al*, 2005). PPAR $\gamma 2$  est hautement exprimé dans les tissus adipeux blancs et joue un rôle crucial dans la différenciation des adipocytes. Cette isoforme possède 28 acides aminés à sa queue N-terminale que les autres isoformes ne possèdent pas. PPAR $\gamma 3$ , quant à lui, est essentiellement présent dans les macrophages, le gros intestin et les tissus adipeux (Kota *et al*, 2005; Diradourian *et al*, 2005). L'expression tissulaire de PPAR $\gamma 4$  reste à être explorée.

Un usage différentiel du promoteur et l'épissage alternatif des transcrits de PPAR $\gamma$ 1,  $\gamma$ 3, et  $\gamma$ 4 résultent, par contre, en une même protéine généralement référée PPAR $\gamma$ 1 (Meirhaeghe *et al*, 2004).

Chaque sous-type de PPAR $\gamma$  s'hétérodimérise avec le récepteur X de l'acide 9-*cis*-rétinoïque X (RXR) et lie son site de liaison, l'élément de réponse de PPAR (PPRE). Le PPRE est un élément d'une séquence directe DR-1 (direct repeat-1) possédant deux répétitions de la séquence consensus AGGTCA, séparées par un seul nucléotide. Il a été démontré que les récepteurs nucléaires, y compris PPAR $\gamma$ , sont impliqués dans l'activation transcriptionnelle de leurs gènes cibles par interaction avec plusieurs coactivateurs et/ou des composantes de la machinerie transcriptionnelle basale (Wallberg *et al*, 2003). Cette interaction peut réguler différents processus cellulaires. Ainsi, PPAR $\gamma$  est impliqué dans la prolifération cellulaire, la différenciation cellulaire et l'apoptose, ainsi que dans certaines conditions pathologiques telles que l'athérosclérose, le cancer, l'obésité et l'inflammation (Beak *et al*, 2004).

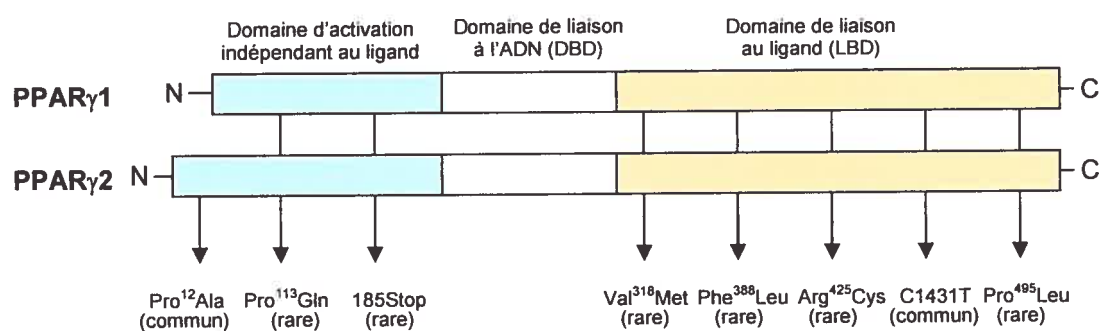
## V.2 Les polymorphismes dans le gène de PPAR $\gamma$

Plusieurs études ont démontré que la susceptibilité de l'OA possède une composante génétique. Parmi ces gènes candidats, on retrouve des gènes structurels de la matrice extracellulaire du cartilage, notamment le gène encodant pour la chaîne polypeptidique  $\alpha$ 1 du collagène de type II, des gènes qui encodent pour des protéines



pouvant influencer la sclérose osseuse tels que le gène du récepteur de la vitamine D et celui du récepteur  $\alpha$  de l'oestrogène ou encore les gènes encodant pour les cytokines inflammatoires tels que l'agrégat des gènes codant pour l'IL-1 (Uitterlinden *et al*, 1997; Loughlin *et al*, 2000, Peach *et al*, 2005).

De plus, des études de mutations rares et de polymorphismes communs dans le gène de PPAR $\gamma$  ont démontré son rôle et son implication dans différentes maladies humaines (Figure 9). Deux polymorphismes de simple nucléotide (SNP) fréquemment étudiés du gène de PPAR $\gamma$  sont la Pro<sup>12</sup>Ala et la C1431T.



**Figure 9 :** Représentation schématique de la structure secondaire et des polymorphismes du gène de PPAR $\gamma$  (modifiée de Knouff et Auwerx, 2004).

### V.2.1 Pro<sup>12</sup>Ala

La Pro<sup>12</sup>Ala est une mutation faux-sens (CCA  $\rightarrow$  GCA) dans l'exon B au codon 12 du gène de PPAR $\gamma$ 2 résultant à la substitution d'une proline pour une alanine. En dépit de l'emplacement de cette mutation dans le domaine d'activation

indépendante des ligands, une substitution de l'Ala<sup>12</sup> réduit l'affinité de liaison de PPAR $\gamma$ 2 à l'élément PPRE et réduit son activité transcriptionnelle en présence ou en absence de ligands (Deeb *et al*, 1998; Masugi *et al*, 2000). La fréquence allélique de cette mutation varie selon le groupe ethnique : elle est de 12 % chez les Caucasiens, 10 % chez les Amérindiens, 8 % chez les Samoans, 4 % chez les Japonais, 3 % chez les Africains-Américains, 2 % chez les Naruans et de 1 % chez les Chinois (Vigoureux *et al*, 2000; Mori *et al*, 2001). La prévalence la plus élevée du polymorphisme est celle chez les Caucasiens (jusqu'à 20 %) (Stumvoll *et al*, 2002). Plusieurs équipes de recherche ont montré une association entre l'allèle d'Ala et un effet protecteur contre le diabète de type 2, ainsi qu'une meilleure sensibilité à l'insuline (Deeb *et al*, 1998; Mori *et al*, 2001; Stumvoll *et al*, 2002). Plusieurs études associent ce polymorphisme à un indice de masse corporelle (IMC) relativement bas (Yen *et al*, 1997; Deeb *et al*, 1998). Ces études iraient même jusqu'à affirmer que cette mutation aurait un effet protecteur contre l'obésité (Li *et al*, 2003). Néanmoins, son effet reste contradictoire puisque d'autres études associent ce polymorphisme avec un IMC élevé (Beamer *et al*, 1998; Valve *et al*, 1999) ou ne trouve aucune corrélation entre la Pro<sup>12</sup>Ala et l'IMC (Meirhaeghe *et al*, 1998; Ek *et al*, 1999; Clement *et al*, 2000). Par ailleurs, quelques travaux ont démontré que la Pro<sup>12</sup>Ala joue un rôle protecteur contre la néphropathie diabétique (Hermann *et al*, 2002; Caramori *et al*, 2003), le développement du syndrome des ovaires polykystiques (Korhonen *et al*, 2003), contre l'infarctus de myocarde (Ridker *et al*, 2003) et l'athérosclérose (Temelkova-Kurktschiev *et al*, 2004).

### V.2.2 C1431T

Le polymorphisme silencieux C1431T est situé dans le domaine de liaison au ligand et se réfère à une mutation de la cytosine à la position 1431 par une thymine. Ce SNP est aussi référé par plusieurs autres noms, entre autres la C161T, pour le nucléotide 161 de l'exon 6 humain, la CAC477CAT, ce qui représente le codon 477 du gène humain de PPAR $\gamma$ 2 ou encore la His449His, référant ainsi au codon 449 du gène de PPAR $\gamma$ 1 (Knouff *et al*, 2004). Ce polymorphisme se manifeste de manière assez fréquente. Elle est retrouvée à une fréquence de 16,3 % chez les Caucasiens-Australiens et de 14 % dans la population française (Knouff *et al*, 2004).

La mutation silencieuse C1431T est curieusement en déséquilibre de liaison avec le polymorphisme Pro<sup>12</sup>Ala. En effet, il a été constaté que les mutations Ala<sup>12</sup> et la T1431 sont présentes ensemble chez 70 % des patients (Doney *et al*, 2002). L'allèle T est associée à des niveaux plus élevés de concentration de leptine que chez les sujets portant l'allèle C (Meirhaeghe *et al*, 1998). Ce polymorphisme a aussi été associé à un risque réduit de maladie coronarienne (Wang *et al*, 1999) de même qu'à un effet protecteur contre la néphropathie de l'immunoglobuline A (Song *et al*, 2003).

### V.3 Les ligands de PPAR $\gamma$

PPAR $\gamma$  est un important régulateur adipogénique et un modulateur d'événement de la signalisation intracellulaire de l'insuline ainsi que de l'homéostasie du glucose et de l'inflammation (Staels *et al*, 2005). Son activation se fait par la liaison de petits ligands lipophiles. Il existe deux types de ligands : les ligands

naturels et les ligands synthétiques. Les ligands naturels de PPAR $\gamma$  comprennent les acides gras polyinsaturés et les dérivés des eicosanoïdes (Tableau III). Ils se lient et activent PPAR $\gamma$  à des concentrations dans l'ordre des micromolaires. PPAR $\gamma$  démontre une préférence pour les acides gras polyinsaturés, principalement les acides gras essentiels comme l'acide linoléique, l'acide linoléique, l'AA, l'EPA et le DHA (Xu *et al*, 1999; Desvergne *et al*, 1999). PPAR $\gamma$  est mieux activé par l'acide hydroxy-octadeca-9Z,11E-dienoïque (9-HODE), 13-HODE et la 15d-PGJ<sub>2</sub> (Kliwer *et al*, 1995). D'autre part, parmi les ligands synthétiques, on retrouve les thiazolidinediones (TZDs) antidiabétiques (aussi nommés glitazones), et les AINS tels que l'indométhacine, la fénoprophène et l'ibuprofène (Tableau IV). Également, à un moindre degré, on distingue parmi les drogues hypolipémiantes les ligands synthétiques qui sont des agents diminuant l'activité lipidique (Kliwer *et al*, 1997; Berger *et al*, 2002). Les TZDs réduisent la résistance à l'insuline et l'hyperglycémie chez les patients diabétiques de type 2 (Meirhaeghe *et al*, 2004). Les agonistes de PPAR $\gamma$  ont un effet direct sur le métabolisme lipidique dans les tissus adipeux et des effets secondaires sur les métabolismes lipidiques et glucidiques dans le foie et les muscles squelettiques (Jiang *et al*, 2002; Way *et al*, 2001).

Ligands Naturels	PPAR $\alpha$	PPAR $\beta$	PPAR $\gamma$
<b>Acides Gras</b>			
Acide Arachidonique	+	+	+
Acide Linoléique	++	+	-
Acide Eicosapentanoïque	++	+/-	++
Acide Docosahexaénoïque	++	+/-	++
9-HODE	ND	ND	++
13-HODE	ND	ND	++
<b>Eicosanoïdes</b>			
PGA1	+	++	+
PGJ <sub>2</sub>	+	+	++
15d-PGJ <sub>2</sub>	+	+/-	+++
8(s)-HETE	+++	-	-
12-HETE	++	ND	ND
15-HETE	ND	ND	+
LTB <sub>4</sub>	+/-	ND	ND

**Tableau III :** Affinité des ligands naturels pour les isoformes des PPARs.

Ligands Synthétiques	PPAR $\alpha$	PPAR $\beta$	PPAR $\gamma$
<b>Drogues Hypolipémiantes</b>			
Wy 14643	+	+	+
Clofibrate	++	+	-
Ciprofibrate	++	+/-	++
Gemfibrozil	++	+/-	++
<b>Thiazolidinediones</b>			
BRL 49653	-	-	+++
Pioglitazone	-	-	++
Troglitazone	-	-	++
<b>AINS</b>			
Indométhacine	+	-	+++
Ibuprofène	+	-	+
Fénoprofène	++	-	+

**Tableau IV :** Affinité des ligands synthétiques pour les isoformes des PPARs.

### V.3.1 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandine $J_2$ (15d-PGJ $_2$ )

Le premier ligand endogène identifié de PPAR $\gamma$  est le dérivé de la prostaglandine cyclopentanoïque, la 15d-PGJ $_2$ , produit de déshydratation de la PGD $_2$  et la PGJ $_2$  (voir Figure 6) (Kliwer *et al*, 1995). Comme les autres PGs, la 15d-PGJ $_2$  est transportée activement dans les cellules (Narumiya *et al*, 1986). Plusieurs travaux supportent le rôle de l'activation de PPAR $\gamma$  dans la régulation des réponses inflammatoires puisque son activation par ses agonistes, en particulier la 15d-PGJ $_2$ , inhibe l'expression de plusieurs protéines ayant des propriétés pro-inflammatoires, notamment la COX-2, le NO synthase inducible (iNOS) et d'autres cytokines

(Daynes *et al*, 2002). Par contre, les mécanismes par lesquels la 15d-PGJ<sub>2</sub> exerce ses effets anti-inflammatoires sont contradictoires. Comme il est établi que la 15d-PGJ<sub>2</sub> active PPAR $\gamma$ , certaines études ont démontré que la 15d-PGJ<sub>2</sub> pouvait induire des réponses indépendamment de PPAR $\gamma$  et utiliserait plutôt la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B (Li *et al*, 2000; Kamei *et al*, 1996; Karin, 1998). Il est clair que la 15d-PGJ<sub>2</sub> est présente *in vivo* (Bell-Parikh *et al*, 2003). En revanche, il est difficile de déterminer précisément sa concentration *in vivo* et ceci est particulièrement vrai dans les tissus de l'articulation (Fahmi *et al*, 2002).

### V.3.2 Troglitazone(TRO)

Les TZDs sont des agents antidiabétiques qui sont couramment prescrits aux patients souffrants de diabète de type 2 et de défaillance cardiaque (Masoudi *et al*, 2005). Les agonistes de PPAR $\gamma$  augmentent la masse des tissus adipeux blancs en promouvant la différenciation des adipocytes. Ils favorisent l'absorption des acides gras libres et redistribuent ainsi les tissus adipeux blancs de manière sous-cutanée au lieu de viscérale. Ceci réduit donc les niveaux d'acides gras libres qui sont associés à une diminution de la résistance à l'insuline. Les TZDs ont une très grande affinité avec PPAR $\gamma$  dans l'ordre du nanomolaire tels que la rosiglitazone, la troglitazone (TRO) et le pioglitazone. Leur sélectivité pour PPAR $\gamma$  étant plus élevée, plusieurs évidences ont démontré que les TZDs exercent leurs effets par un mécanisme dépendant de PPAR $\gamma$ .

#### V.4 PPAR $\gamma$ dans les tissus articulaires

Plusieurs études dont les nôtres démontrent la présence de PPAR $\gamma$  dans les tissus articulaires, notamment dans le cartilage humain et dans les cultures de chondrocytes (Fahmi *et al*, 2001; Shan *et al*, 2004).

La présence de PPAR $\gamma$  dans les chondrocytes de rats a été établie au niveau de la protéine et de l'ARNm. De plus, l'activation de PPAR $\gamma$ , par la 15d-PGJ<sub>2</sub> et la TRO, contrairement à PPAR $\alpha$ , annihile la baisse de synthèse de protéoglycanes et la production de NO induite par l'IL-1 $\beta$  (Bordji *et al*, 2000).

Par ailleurs, les productions de NO et de la MMP-13 induites par différentes cytokines pro-inflammatoires sont diminuées lorsque les chondrocytes humains sont traités avec les ligands 15d-PGJ<sub>2</sub> et BRL 49563, un ligand synthétique de PPAR $\gamma$ . Leurs expressions stimulées par l'IL-1 $\beta$  ont aussi été diminuées d'une manière dose-dépendante par la 15d-PGJ<sub>2</sub> (Fahmi *et al*, 2001). Cette inhibition se fait au niveau transcriptionnel et est en partie dépendante de PPAR $\gamma$ . D'autre part, cet effet est aussi médié par l'inhibition de l'activité des facteurs de transcription AP-1 et NF- $\kappa$ B.

L'expression de PPAR $\gamma$  a été étudiée dans les tissus synoviaux et dans les cultures de synoviocytes AR. Ces études démontrent que PPAR $\gamma$  est présent et induit dans les macrophages ainsi que dans les couches de cellules superficielles et les fibroblastes synoviaux, et dans les cellules endothéliales (Kawahito *et al*, 2000). De plus, l'activation de PPAR $\gamma$  par ses ligands inhibe la prolifération des synoviocytes et induit l'apoptose, expliquant ainsi les effets anti-inflammatoires de PPAR $\gamma$ . Dans une



autre étude, l'expression de l'ARNm de PPAR $\gamma$  a été démontrée chez les synoviocytes de patients normaux, OA et AR, ainsi que l'expression de la protéine chez les patients AR (Ji *et al*, 2001). De plus, son activation, qui engendre parallèlement l'activation de NF- $\kappa$ B, inhibe l'expression induite des cytokines TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$  dans les synoviocytes AR et OA.

Notre équipe a, par ailleurs, démontré que l'activation de PPAR $\gamma$  dans les synoviocytes humains inhibe la production de la MMP-1 induite par l'IL-1 $\beta$  en inhibant l'activité de liaison du facteur de transcription AP-1. La 15d-PGJ<sub>2</sub> inhibe même l'activité de liaison à l'ADN d'AP-1 à son niveau basal, sans aucune stimulation par l'IL-1 $\beta$  (Fahmi *et al*, 2002).

La 15d-PGJ<sub>2</sub> non seulement exerce ses effets inhibiteurs sur la production de la PGE<sub>2</sub>, mais aussi sur l'expression de la COX-2 (Tsubouchi *et al*, 2001; Farrajota *et al*, 2005) et celle de la PLA<sub>2</sub> cytosolique (cPLA<sub>2</sub>) (Tsubouchi *et al*, 2001). Ceci illustre un rétrocontrôle de la cascade de l'AA par la 15d-PGJ<sub>2</sub>.

L'équipe de recherche d'Eguchi a constaté que l'interféron gamma (IFN- $\gamma$ ), de manière plus prononcée que le TNF- $\alpha$  ou l'IL-1 $\beta$ , inhibe l'expression de PPAR $\gamma$  induite par la TRO dans les synoviocytes humains AR et inhibe ainsi la différenciation induite des synoviocytes en adipocytes (Yamasaki *et al*, 2004).

Il a aussi été démontré que PPAR $\gamma$  est exprimé dans les ostéoclastes et que l'activation de PPAR $\gamma$  inhibe la différenciation de ces cellules à partir de cellules souches hématopoïétiques par l'inhibition de la voie de NF- $\kappa$ B (Mbalaviele *et al*, 2000).

### V.5 Propriétés anti-inflammatoire de PPAR $\gamma$

Il est bien établi que PPAR $\gamma$  possède des propriétés anti-inflammatoires et exerce même un effet protecteur. Il a été prouvé que l'activation de PPAR $\gamma$  inhibe la prolifération et induit l'apoptose des macrophages, des fibroblastes et des cellules endothéliales (Chinetti *et al*, 1998; Kawahito *et al*, 2000). De plus, les AINS induisent l'apoptose dans plusieurs types cellulaires, notamment dans les synoviocytes. Certains AINS en combinaison avec les ligands de PPAR $\gamma$  stimulent l'activation de PPAR $\gamma$  en corrélation avec leurs habilités à réduire la viabilité cellulaire et à induire la fragmentation de l'ADN dans les synoviocytes (Yamazaki *et al*, 2002). Ceci implique que l'activation de la voie de PPAR $\gamma$  par ces AINS est associée aux effets apoptotiques de certains AINS et contribuerait à la réduction de la destruction du cartilage.

Aussi, PPAR $\gamma$  exerce ses fonctions anti-inflammatoires en régulant négativement la production des cytokines et des MMPs. En effet, il a été constaté qu'une activation de PPAR $\gamma$  par la TRO inhibait la production de l'IL-6, de l'IL-8, du TNF- $\alpha$  et de la MMP-3. Ces cytokines et la MMP-3 sont tous des médiateurs inflammatoires qui jouent un rôle essentiel dans la physiopathologie de l'OA (Yamasaki *et al*, 2002). De plus, cette même étude a démontré que l'activation de PPAR $\gamma$  peut moduler les fonctions des synoviocytes humains dans l'inhibition des activités pro-inflammatoires lorsque les concentrations utilisées sont relativement basses et ce, sans induire l'apoptose.

L'expression de PPAR $\gamma$  a été démontrée comme possédant des effets anti-inflammatoires en réduisant l'expression de l'IL-1 $\beta$  et de la MMP-1 (François *et al*, 2004; Bordji *et al*, 2000).

#### V.6 Modèles animaux impliquant l'activation de PPAR $\gamma$

Plusieurs modèles d'animaux ont été utilisés pour prouver que PPAR $\gamma$  et ses ligands possèdent des propriétés anti-inflammatoires.

Notamment, dans un modèle d'arthrite induit à l'adjuvant chez la femelle du rat Lewis, l'administration intrapéritonéale de la 15d-PGJ<sub>2</sub> ou de la TRO améliore l'œdème en prévenant l'infiltration des cellules mononucléaires et en prévenant la formation de pannus dans les tissus synoviaux (Kawahito *et al*, 2000). En ce qui concerne le modèle OA chez le rat Wistar induit au mono-iodoacétate (MIA), l'expression de la COX-2 est retrouvée légèrement augmentée. Toutefois, celle de PPAR $\gamma$  reste inchangée suite à une induction par le MIA dans les tissus synoviaux (Dumond *et al*, 2004).

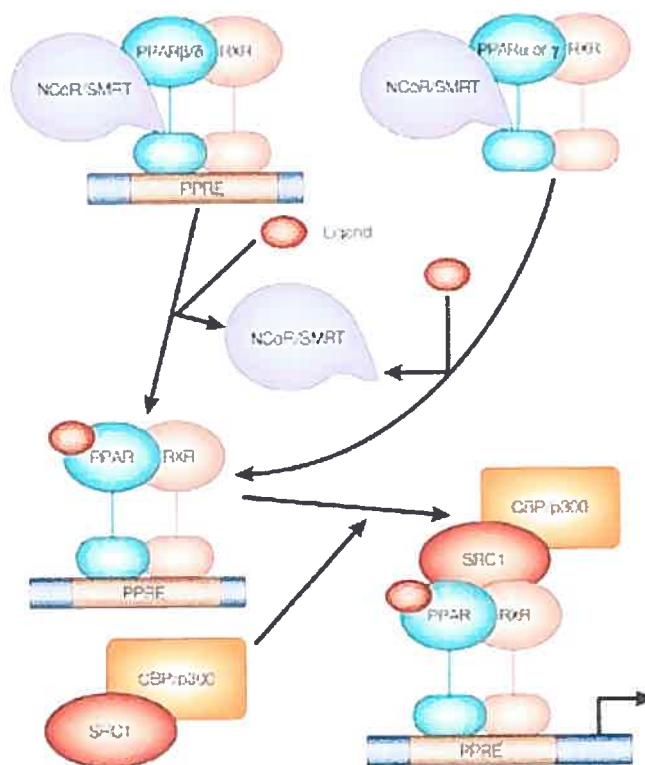
En revanche, dans un modèle d'arthrite à l'adjuvant chez la souris, l'administration des ligands de PPAR $\gamma$ , le rosiglitazone et le pioglitazone, inhibe de manière significative la formation de nitrotyrosine, une substance produite durant l'inflammation associée à l'arthrite, et l'expression d'iNOS dans les articulations (Shiojiri *et al*, 2002). Similairement dans les essais *in vitro*, l'expression protéique des médiateurs d'inflammation iNOS, ICAM-1 (intracellular adhesion molecule-1),

COX-2 et de nitrotyrosine est diminuée dans les cellules RAW 264 (cellules monocytaires d'origine murine) stimulées par le TNF- $\alpha$  et par le LPS (Shiojiri *et al*, 2002). Ces modèles d'animaux démontrent non seulement les propriétés anti-inflammatoires de PPAR $\gamma$ , mais également que PPAR $\gamma$  joue un rôle protecteur contre les maladies arthritiques.

#### *V.7 Mécanismes d'action de PPAR $\gamma$*

Comme PPAR $\gamma$  est un récepteur nucléaire, plusieurs coactivateurs ou corépresseurs modulent son activité pour initier ou supprimer la transcription, conduisant ainsi à l'activation ou la répression des gènes, respectivement. En absence de ligands, les récepteurs nucléaires sont liés à des complexes corépresseurs tels que « nuclear receptor-corepressor » (N-COR) et « silencing mediator for retinoid acid receptor and thyroid receptor » (SMRT) (Fernandes *et al*, 2003). Ces derniers font partie de complexes multiprotéiques qui sont impliqués dans la répression transcriptionnelle et souvent accompagnés de la désacétylation des histones (Fernandes *et al*, 2003). PPAR $\gamma$  ne peut se lier à l'ADN lorsqu'il est associé à ce complexe corépresseur. Lors de la liaison de son ligand au domaine de liaison (LBD), il y a échange du complexe corépresseur lié sur les récepteurs pour un complexe coactivateur (Figure 10). Ces coactivateurs de motif LXXLL se lient au domaine de liaison à l'ADN (DBD). Parmi ces coactivateurs, on retrouve les protéines de la famille « steroid receptor coactivator-1 » (SRC-1)/p160, les protéines de la famille « glucocorticoid receptor interacting protein-1 » (GRIP-1) ainsi que les protéines de

la famille p300/ « CREB-binding protein » (CBP) (McKenna *et al*, 2002; Fu *et al*, 2004). Ces coactivateurs possèdent une activité histone acétyl transférase (HAT) qui facilite l'activation transcriptionnelle des gènes cibles. D'autres coactivateurs identifiés sont les complexes remodelant de la chromatine ATP-dépendante et les méthyltransférases. Tous ces coactivateurs ont pour effet de faciliter l'activation d'un gène cible en augmentant l'accessibilité du promoteur à la machinerie transcriptionnelle. Suite au recrutement ligand-dépendant de coactivateurs à l'hétérodimère PPAR-RXR, ce complexe peut maintenant se lier au PPRE. Deux mécanismes hypothétiques expliqueraient l'effet inhibiteur de PPAR $\gamma$  sur les gènes pro-inflammatoires : un mécanisme dépendant de PPAR $\gamma$  tandis que l'autre est indépendant de PPAR $\gamma$ .



**Figure 10 :** Mécanisme d'action de PPAR $\gamma$  par les ligands (d'après Daynes *et al*, 2002).

### *V.6.1 Mécanismes d'action via PPAR $\gamma$*

Le mécanisme d'activation de PPAR $\gamma$  impliquerait la liaison de PPAR $\gamma$  à un PPRE, ce qui induirait l'activation de la transcription d'un gène anti-inflammatoire. Ce mécanisme est aussi dit PPAR $\gamma$ -dépendant.

### *V.6.2 Mécanismes d'action indépendant de PPAR $\gamma$*

Comme plusieurs études ont suggéré que les effets inhibiteurs de la 15d-PGJ<sub>2</sub> se faisaient au niveau transcriptionnel via PPAR $\gamma$ , d'autres études, elles, considèrent les effets moins prononcés des ligands synthétiques de PPAR $\gamma$  suggérant un mécanisme indépendant de PPAR $\gamma$ . Il a été démontré que la 15d-PGJ<sub>2</sub>, et non la troglitazone, module les effets de l'IL-1 $\beta$  en empêchant l'activation des voies de signalisation de NF- $\kappa$ B et d'AP-1 (Boyault *et al*, 2001). Ceci indiquerait que la 15d-PGJ<sub>2</sub> pourrait emprunter des voies alternatives pour exercer ses effets anti-inflammatoires et agir indépendamment à PPAR $\gamma$ . Le facteur de transcription NF- $\kappa$ B est reconnu comme étant un médiateur des réponses inflammatoires par l'activation transcriptionnelle de plusieurs gènes de cytokines inflammatoires, comme le TNF- $\alpha$ , l'IL-1 $\beta$  et l'IL-6 (Shakhov *et al*, 1990; Abe *et al*, 1997). La 15d-PGJ<sub>2</sub> pourrait inhiber la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B à plusieurs niveaux. Un premier mécanisme possible serait la compétition entre PPAR $\gamma$  activé et NF- $\kappa$ B pour des coactivateurs puisque NF- $\kappa$ B et les membres de sa famille requièrent aussi l'assistance des mêmes coactivateurs pour l'initiation de la régulation des gènes tels

que CBP/p300 ou SRC-1 (Li *et al*, 2000). Cette transrépression des agonistes de PPAR $\gamma$ , aussi connue comme étant PPAR $\gamma$ -indépendante, expliquerait l'effet anti-inflammatoire des ligands de PPAR $\gamma$ . Il est aussi suggéré que PPAR $\gamma$  s'opposerait à l'activité d'AP-1 et de NF- $\kappa$ B par interaction protéine-protéine (Kamei *et al*, 1996; Karin, 1998). Deux mécanismes ont été proposés pour l'effet inhibiteur de la 15d-PGJ<sub>2</sub> sur la transcription dépendante de NF- $\kappa$ B (Strauss *et al*, 2000; Rossi *et al*, 2000). Premièrement, par modification covalente des résidus cystéine dans le domaine de liaison à l'ADN de la sous-unité p65 d'IKK (I- $\kappa$ B kinase), la 15d-PGJ<sub>2</sub> inhiberait la translocation de NF- $\kappa$ B dans le noyau en empêchant la dégradation de I $\kappa$ B. Deuxièmement, la 15d-PGJ<sub>2</sub> peut aussi inhiber l'activation de NF- $\kappa$ B en se liant directement sur NF- $\kappa$ B sans empêcher la dégradation de I $\kappa$ B ou la translocation de NF- $\kappa$ B (Strauss *et al*, 2000). L'inhibition de l'activité d'AP-1 par la 15d-PGJ<sub>2</sub> quant à elle, est due à une interaction protéine-protéine ou encore une interaction protéine-ADN. La 15d-PGJ<sub>2</sub> modifierait de manière covalente la sous-unité c-Jun d'AP-1 en se liant au domaine de liaison à l'ADN de cette sous-unité et empêcherait l'activité de liaison d'AP-1 à l'ADN (Perez-Sala *et al*, 2003).



## B. HYPOTHÈSE DE RECHERCHE ET OBJECTIFS

L'OA est une maladie associée à la dégénération du cartilage, le remodelage de l'os sous-chondral ainsi qu'une inflammation de la membrane synoviale. L'ensemble de ces modifications structurelles et fonctionnelles conduit à une perte importante de la mobilité de l'articulation. Les traitements disponibles présentement ne sont pas assez spécifiques et leur utilisation est associée à d'importants effets secondaires.

La PGE<sub>2</sub> est la principale PG produite dans les tissus articulaires et des niveaux élevés de la PGE<sub>2</sub> ont été retrouvés dans le sérum et le liquide synovial des patients souffrant d'OA. De nombreuses études *in vivo* et *in vitro* ont démontré que la PGE<sub>2</sub> est responsable de la douleur, de l'oedème et de la destruction des tissus articulaires. La production de la PGE<sub>2</sub> peut être induite par des cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-1 $\beta$ .

La PGES est l'enzyme responsable de la dernière étape dans la biosynthèse de la PGE<sub>2</sub>. Des travaux *in vivo* et *in vitro* ont montré que l'activité de la mPGES-1 est couplée à celle de la COX-2 et est responsable de la production induite de la PGE<sub>2</sub>.

Le PPAR $\gamma$ , un facteur de transcription activé par des ligands spécifiques, est capable de réguler un certain nombre de gènes inflammatoires dans plusieurs types cellulaires.

Nous pensons qu'une inhibition de l'activité et/ou de l'expression de la mPGES-1 permettrait d'inhiber sélectivement la production de la  $\text{PGE}_2$  et constituerait une stratégie anti-inflammatoire plus efficace dans le traitement de l'OA. Il est donc nécessaire de mieux comprendre les mécanismes qui régulent l'expression de la mPGES-1. De plus, il est bien établi que l'OA possède une prédisposition génétique. Nous croyons qu'il existe une association entre deux polymorphismes du gène de  $\text{PPAR}\gamma$  et la susceptibilité et/ou la sévérité de l'OA.

Les objectifs de ce projet de recherche sont, d'une part, d'étudier les effets des ligands de  $\text{PPAR}\gamma$  sur la régulation de l'expression de la mPGES-1 dans les synoviocytes humains. D'autre part, il s'agit d'identifier la contribution de deux polymorphismes de  $\text{PPAR}\gamma$ , la  $\text{Pro}^{12}\text{Ala}$  et la  $\text{C1431T}$ , à la susceptibilité et/ou à la sévérité de l'OA dans une population canadienne-française.

Dans le but de trouver de nouvelles façons de traiter l'OA, cette étude permettra d'obtenir une meilleure compréhension sur les mécanismes impliqués dans la régulation de la mPGES-1, une nouvelle cible thérapeutique dans l'OA. De plus,  $\text{PPAR}\gamma$  ayant des propriétés anti-inflammatoires, une meilleure compréhension de ses rôles par les études polymorphiques éclairciront la contribution de deux polymorphismes du gène de  $\text{PPAR}\gamma$  dans l'OA. En somme, cette étude conduira à une meilleure compréhension des mécanismes impliqués dans l'OA pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques.



## C. MANUSCRIPTS

**Activation of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\gamma$  Inhibits Interleukin-1 $\beta$ -Induced mPGES-1 Expression in Human Synovial Fibroblasts by Interfering with Egr-1\*.**

Saranette Cheng<sup>‡¶</sup>, Hassan Afif<sup>‡</sup>, Johanne Martel-Pelletier<sup>‡</sup>, Jean-Pierre Pelletier<sup>‡</sup>, Xinfang Li<sup>‡¶</sup>, Katherine Farrajota<sup>‡</sup>, Martin Lavigne<sup>†</sup>, and Hassan Fahmi<sup>‡ ¶ §</sup>.

From the <sup>‡</sup>Osteoarthritis Research Unit, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Hôpital Notre-Dame; <sup>¶</sup>Department of Medecine, Université de Montréal; <sup>†</sup>Hôpital Maisonneuve-Rosemont, Montréal, Québec, Canada.

§To whom correspondance should be addressed:

Hassan Fahmi, Ph.D.

Osteoarthritis Research Unit,

Centre Hospitalier de l'Université de Montréal,

Hôpital Notre-Dame, 1560 Sherbrooke St. East. Montréal, Québec, Canada. H2L 4M1.

TEL (514) 890 8000 Ext 28910

FAX (514) 412 7583

E-mail: [REDACTED]

**Running Title:** Inhibition of mPGES-1 Gene Expression by PPAR $\gamma$  Ligands

## SUMMARY

Membrane-associated prostaglandin (PG) E<sub>2</sub> synthase-1 (mPGES-1) catalyzes the conversion of PGH<sub>2</sub> to PGE<sub>2</sub>, which contributes to many biological processes. Peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) is a ligand-activated transcription factor and plays an important role in growth, differentiation, and inflammation in different tissues. Here, we examined the effect of PPAR $\gamma$  ligands on interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )-induced mPGES-1 expression in human synovial fibroblasts (HSF). PPAR $\gamma$  ligands 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$  prostaglandin J<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) and the thiazolidinedione troglitazone (TRO), but not PPAR $\alpha$  ligand Wy14643, dose-dependently suppressed IL-1 $\beta$ -induced PGE<sub>2</sub> production, as well as mPGES-1 protein and mRNA expression. 15d-PGJ<sub>2</sub> and TRO suppressed IL-1 $\beta$ -induced activation of the mPGES-1 promoter. Overexpression of wild-type PPAR $\gamma$  further enhanced, whereas overexpression of a dominant negative PPAR $\gamma$  alleviated, the suppressive effect of both PPAR $\gamma$  ligands. Furthermore, pretreatment with an antagonist of PPAR $\gamma$ , GW9662, relieves the suppressive effect of PPAR $\gamma$  ligands on mPGES-1 protein expression, suggesting that the inhibition of mPGES-1 expression is mediated by PPAR $\gamma$ . Previous studies have shown that Egr-1 plays a pivotal role in transactivation of mPGES-1 gene. We demonstrated that PPAR $\gamma$  ligands suppressed Egr-1-mediated induction of the activities of the mPGES-1 promoter and of a synthetic reporter construct containing three tandem repeats of an Egr-1 binding site. The suppressive effect of PPAR $\gamma$  ligands was enhanced in the presence of a PPAR $\gamma$  expression plamid. Electrophoretic mobility shift and supershift assays for Egr-1 binding sites in the mPGES-1 promoter showed that both 15d-PGJ<sub>2</sub> and TRO suppressed IL-1 $\beta$ -

induced DNA binding activity of Egr-1. This occurs without interfering with Egr-1 expression. These data define mPGES-1 and Egr-1 as novel targets of PPAR $\gamma$  and suggest that inhibition of mPGES-1 gene transcription may be one of the mechanisms by which PPAR $\gamma$  regulates inflammatory responses.

## INTRODUCTION

Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>) is an important modulator of many physiological and pathophysiological conditions including, cell growth, vascular homeostasis, inflammation, immune regulation, cancer, and arthritis (1, 2). The biosynthesis of PGE<sub>2</sub> requires two enzymes. Cyclooxygenase (COX; also termed PGH synthase), converts arachidonic acid into PGH<sub>2</sub>. Subsequently, PGE synthase (PGES) converts COX-2 derived PGH<sub>2</sub> to PGE<sub>2</sub>. Two isoforms of COX exist, COX-1 and COX-2, with similar enzymatic properties but distinctly different biological functions. COX-1 is expressed in most tissues and is responsible for physiological production of PGs. COX-2, in contrast, is almost undetectable under physiologic conditions but is strongly induced in response to pro-inflammatory stimuli, growth factors, and mitogens (1-3).

At least three distinct PGES isoforms have been identified, including microsomal PGES-1 (mPGES-1), which was originally designated MGST1-L-1 (for membrane-bound GST1-like-1) (4, 5), mPGES-2 (6), and cytosolic PGES (cPGES, or the heat shock protein-associated protein p23) (7). cPGES is constitutively and ubiquitously expressed and is preferentially coupled with COX-1 promoting immediate production of PGE<sub>2</sub> (7, 8). By contrast, mPGES-1 is markedly upregulated by proinflammatory stimuli and is functionally coupled with COX-2 promoting delayed PGE<sub>2</sub> synthesis (4, 5, 9). mPGES-2 is ubiquitously expressed in diverse tissues (6); however, its role remains elusive. Studies with deletion of mPGES-1 demonstrated that this isoform is largely responsible for the production of PGE<sub>2</sub> both in vitro and in vivo (10, 11).

mPGES-1 protein expression is induced in vitro in several cell types after

treatment with the proinflammatory cytokines, interleukin(IL)-1 $\beta$ , and tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$

and is down-regulated by antiinflammatory glucocorticoids (5, 12, 13). Moreover, mPGES-1 was shown to be upregulated in vivo in an animal model of rheumatoid arthritis (9) and lipopolysaccharides-induced pyresis (5). Increased levels of mPGES-1 mRNA and protein were also detected in symptomatic atherosclerotic plaques, as well as various cancer cell lines and carcinoma (14-18), suggesting that aberrant expression of this enzyme could contribute to the pathogenesis of these disorders. Therefore, mPGES-1 may constitute a potential target for therapeutic intervention.

Peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) are a family of ligand-activated transcription factor belonging to the nuclear receptor superfamily (19). To date, three PPAR subtypes have been identified: PPAR $\alpha$ , PPAR $\beta/\delta$  and PPAR $\gamma$ . PPAR $\alpha$  is highly expressed in the liver, heart, kidney, and intestinal mucosa, where it regulates lipid metabolism. PPAR $\gamma$  is predominantly expressed in adipose tissue and regulates adipocyte differentiation. PPAR $\alpha$  is activated by eicosanoids, fatty acids and the hypolipidemic drug Wy14643 (selective for PPAR $\alpha$ ). PPAR $\gamma$  is activated by the prostaglandin D<sub>2</sub> metabolite 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub> (15d-PGJ<sub>2</sub>) and synthetic anti-diabetic thiazolidinedione drugs (e.g. troglitazone) (19). There is accumulating evidence that PPAR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  are implicated as important regulators of immune and inflammatory responses. PPAR $\alpha$  activation inhibits inflammatory mediators release from several cell types (20-22). In addition, PPAR $\alpha$ -deficient mice exhibited exacerbated inflammatory responses (23). PPAR $\gamma$  activation results in the inhibition



of various inflammatory events, such as the production of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , and IL-6 in monocytes/macrophages as well as the proliferation and the production of IL-2 by T lymphocytes (24-26). Moreover, we have observed that PPAR $\gamma$  ligands can suppress the expression of the inducible nitric oxide synthase (iNOS), MMP-13 and COX-2 in human chondrocytes and the expression of MMP-1 in human synovial fibroblasts (19, 27, 28). These actions of PPAR $\gamma$  ligands were proven through repression of activities of many transcription factors including nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), activator protein 1 (AP-1), signal transducers and activators of transcription (STATs), and nuclear factor of activated T cells (NFAT) (19, 24-28).

To date, limited information is available on the effect of PPAR $\gamma$  ligands on the induction of mPGES-1. Here, we analyze the effect of two PPAR $\gamma$  ligands, 15d-PGJ<sub>2</sub> and troglitazone, on IL-1 $\beta$ -induced-mPGES-1 expression in human synovial fibroblasts and investigate the mechanisms underlying this regulation.

## EXPERIMENTAL PROCEDURES

*Materials*-Human recombinant IL-1 $\beta$  was obtained from R&D Systems Inc. 15d-PGJ<sub>2</sub>, troglitazone (TRO), Wyl4643, GW9226, and enzyme immunoassay reagents for PGE<sub>2</sub> assays were purchased from Cayman Chemical. Aprotinin, leupeptin, pepstatin, and phenylmethylsulphonyl fluoride (PMSF) were from Sigma-Aldrich. Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), penicillin and streptomycin, fetal calf serum (FCS) and Trizol reagent were supplied by Invitrogen. [<sup>32</sup>P]ATP was from Amersham. Plasmid DNA was prepared using a kit from Qiagen. FuGene 6 transfection reagent was from Roche Applied Science. The luciferase reporter assay system was from Promega. All other chemicals were purchased from either Fisher Scientific or Bio-Rad. Anti-mPGES-1 antibody was from Cayman Chemical, whereas anti-cPGES antibodies were from Cayman Chemical or Affinity BioReagents. Antibodies against Egr-1, PPAR $\gamma$ , and  $\beta$ -actin were purchased from Santa Cruz Biotechnology Inc. Polyclonal rabbit anti-mouse IgG coupled with HRP and polyclonal goat anti-rabbit IgG with HRP were from Pierce.

*Specimen selection and cell culture*- HSF were isolated from synovial membranes obtained from osteoarthritic (OA) patients undergoing total knee joint replacement. All OA patients were evaluated by a certified rheumatologist and diagnosed on criteria developed by the American College of Rheumatology Diagnostic Subcommittee for OA (29). Briefly, synovial fibroblasts were released by sequential enzymatic digestion with 1 mg/ml pronase (Roche Applied Science) for 1 h, followed by a 6 h incubation with 2 mg/ml collagenase (Type IA, Sigma) at 37 °C in DMEM supplemented with 10 % heat-inactivated FCS, 100 units/ml penicillin and

100 µg/ml streptomycin. Cells were incubated for 1 h at 37°C in tissue culture flasks (Primaria 3824, Falcon, Lincoln Park, NJ) allowing the adherence of nonfibroblastic cells possibly present in the cell preparation. In addition, flow cytometric analysis (Epic II, Coulter, Miami, FL) using the anti-CD14 (fluorescein isothiocyanate) antibody confirmed that no monocyte/macrophages were present in the synovial fibroblast preparation. The cells were seeded in tissue culture flasks and cultured until confluence in DMEM supplemented with 10 % FCS and antibiotics at 37° C in a humidified atmosphere of 5 % CO<sub>2</sub>/ 95 % air. Only cells between passages 3 and 7 were used.

*PGE<sub>2</sub> assays*- At the end of the incubation period, the culture medium was collected and stored at – 80° C. Levels of PGE<sub>2</sub> were determined using a PGE<sub>2</sub> enzyme immunoassay kit from Cayman Chemical. The detection limit and sensitivity was 9 pg/ml. All assays were performed in duplicate.

*Western blot analysis*-Cells were lysed in ice-cold lysis buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 mM PMSF, 10 µg/ml each of aprotinin, leupeptin and pepstatin, 1 % NP-40, 1 mM sodium orthovanadate (Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>), and 1 mM NaF). Lysates were sonicated on ice and centrifuged at 12 000 rpm for 15 min. The protein concentration of the supernatant was determined using the bicinchoninic acid method (Pierce). Twenty µg of total cell lysate or nuclear extracts were subjected to SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and electrotransferred to a nitrocellulose membrane (Bio-Rad). After blocking in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, containing 150 mM NaCl, 0,1 % Tween 20, and 5 % (w/v) non-fat dry milk, blots

were incubated overnight at 4 °C with primary antibodies and washed with wash buffer (TBS pH 7.5, with 0.1 % Tween 20). The blots were then incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Pierce), washed again, incubated with SuperSignal Ultra Chemiluminescent reagent (Pierce) and finally exposed to Kodak X-Omat film (Eastman Kodak Ltd, Rochester, NY).

*RNA extraction and cDNA synthesis*-Total RNA was isolated from HSF using the TRIzol reagent (Invitrogen), and dissolved in 20 µl of diethylpyrocarbonate (DEPC)-treated-H<sub>2</sub>O. One µg of total RNA was treated with RNase-free DNase and reverse-transcribed using Moloney Murine Leukemia Virus reverse transcriptase (Fermentas, Burlington, ON, Canada) as detailed in the manufacturer's guidelines. One fiftieth of the reverse transcriptase reaction was analyzed by real-time PCR as described below. The following primers were used: mPGES-1: sense 5'-GAAGAAGGCCTTTGCCAAC-3' and antisense 5'-GGAAGACCAGGAAGTGCATC-3'; cPGES : sense 5'-GCAAAGTGGTACGATCGAAGG-3' and antisense 5'-TGTCCTGTTCTTTTATGCTTGG-3'; and GAPDH :sense 5'-CAGAACATCATCCCTGCCTCT-3' and antisense 5'-GCTTGACAAAGTGGTCGTTGAG -3'.

*Real-time Quantitative PCR*- Quantitative PCR analysis was performed in a total volume of 50 µl containing cDNA template, 200 nM of sense and antisense primers and 25 µl of SYBR<sup>®</sup> Green master mix (Qiagen). Incorporation of SYBR<sup>®</sup> Green dye into PCR products was monitored in real time using a Gene Amp 5700

sequence detector (Applied Biosystems) allowing determination of the threshold cycle ( $C_T$ ) at which exponential amplification of PCR products begins. After incubation at 95° C for 10 min to activate the AmpliTaq Gold enzyme, the mixtures were subjected to 40 amplification cycles (15 s at 95° C for denaturation and 1 min for annealing and extension at 60° C). After PCR, dissociation curves were generated with one peak, indicating the specificity of the amplification. A threshold cycle ( $C_T$  value) was obtained from each amplification curve using the software provided by the manufacturer (Applied Biosystems). Data were expressed as –fold changes relative to control conditions (unstimulated cells) using the  $\Delta\Delta C_T$  method as detailed in the manufacturer's guidelines (Applied Biosystems). A  $\Delta C_T$  value was first calculated by subtracting the  $C_T$  value for the housekeeping gene GAPDH from the  $C_T$  value for each sample. A  $\Delta\Delta C_T$  value was then calculated by subtracting the  $\Delta C_T$  value of the control from the  $\Delta C_T$  value of each treatment. Fold changes compared with the control (unstimulated cells) were then determined by raising 2 to the  $\Delta\Delta C_T$  power. Each PCR reaction generated only the expected specific amplicon as shown by the melting-temperature profiles of the final product and by gel electrophoresis of test PCR reactions. Each PCR was performed in triplicate on two separate occasions from at least three independent experiments.

*Plasmids and transient transfection*-The human mPGES-1 promoter construct (-538/-28) was kindly provided by Dr. Terry J. Smith (University of California, Los Angeles) (13). The human expression vectors for wild type and dominant negative PPAR $\gamma$  were a kind gift from Dr. Krishna K. Chatterjee (University of Cambridge,

Cambridge, UK) (30). The human Egr-1 expression vector and the pEgr-1Mutx3-TK-Luc reporter construct were generously provided by Dr. Yuqing E. Chen (Morehouse School of Medicine, Atlanta) (31).

A  $\beta$ -galactosidase reporter vector under the control of SV40 promoter (pSV40- $\beta$ -galactosidase) was from Promega.

Transient transfection experiments were performed using FuGene-6 (1  $\mu$ g DNA: 4  $\mu$ l FuGene 6) (Roche Applied Science) according to the manufacturer's recommended protocol. Briefly, HSF were seeded and grown to 50-60% confluence. The cells were transfected with 1  $\mu$ g of the reporter construct and 0.5  $\mu$ g of the internal control pSV40- $\beta$ -galactosidase. In cotransfection experiments the amount of transfected DNA was kept constant by using a corresponding empty vector. Six hours later, the medium was replaced with DMEM containing 1 % FCS. The next day, the cells were treated for another 14 h with or without IL-1 $\beta$  in the absence or presence of 15d-PGJ<sub>2</sub> or TRO. After harvesting, luciferase activity was determined and normalized to  $\beta$ -galactosidase activity (27).

*Nuclear Extract Preparation and Electrophoretic Mobility Shift Assay-*

Nuclear extracts were prepared as previously described (28). Briefly, HSF were washed in ice-cold PBS and gently scrapped in ice-cold hypotonic buffer containing 10 mM HEPES-KOH, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT, 1 mM PMSF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and 10  $\mu$ g/ml of aprotinin, leupeptin, and pepstatin. The cells were allowed to swell on ice and the nuclei were recovered by brief centrifugation. The pellets were resuspended in high salt buffer containing 20 mM HEPES, pH 7.9,

420 mM NaCl, 1.2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.5 mM DTT, 0.2 mM EDTA, 25 % glycerol, 0.5 mM PMSF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> and 10 µg/ml of aprotinin, leupeptin, and pepstatin, followed by incubation on ice for 20 min. The nuclear extracts were recovered by centrifugation and protein concentration was determined by the method of Bradford (Bio-Rad).

A synthetic double-stranded oligonucleotide, corresponding to the Egr-1 motifs in the human mPGES-1 promoter (5'-GTGGGGCGGGGCGTGGGCGGTGCT-3'), was end-labeled by T4 polynucleotide kinase in the presence of [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP. The mutant competitor oligonucleotide had the following sequence with a 4-bp substitution (underlined): 5'-GTGGTTCGGGGCGTGTTCGGTGCT-3'. The binding buffer consisted of 10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 50 mM NaCl, 0.5 mM DTT, 0.5 mM EDTA, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 4 % glycerol and 2.5 µg poly (dI-dC). Binding reactions were conducted with 5 µg nuclear extract and 100,000 cpm <sup>32</sup>P-labeled oligonucleotide probe at 22 °C for 20 min in a final volume of 10 µl. In supershift assays, the antibody to Egr-1 (1 µg/reaction) was incubated with the reaction mixture for 1 h at 4 °C before the addition of <sup>32</sup>P-labeled oligonucleotide. In cold competition assays, 100-fold molar excess of cold wild-type or mutant oligonucleotide was used. Binding complexes were resolved on non-denaturing 6% polyacrylamide gel electrophoresis in Tris-borate buffer system, after which the gels were fixed, dried, and subjected to autoradiography.

*Statistical analysis*-All results were calculated as the mean  $\pm$  SEM of

independent experiments. Statistics were analyzed using Student's 2-tailed t-test. p values less than 0.05 were considered significant.



## RESULTS

*Effect of PPAR ligands on IL-1 $\beta$ -induced PGE<sub>2</sub> production and mPGES-1 protein expression in HSF*-We initially examined the effect of three distinct classes of PPAR ligands on IL-1 $\beta$ -induced PGE<sub>2</sub> production in HSF. 15d-PGJ<sub>2</sub> and TRO, natural and synthetic PPAR $\gamma$  activators respectively, and Wy14643, a selective PPAR $\alpha$  activator. Quiescent HSF were stimulated with IL-1 $\beta$  (100 pg/ml) in the absence or presence of increasing concentrations of 15d-PGJ<sub>2</sub> (5, 10, and 20  $\mu$ M), TRO or Wy14643 (10, 25, and 50  $\mu$ M), and PGE<sub>2</sub> production was determined. Under control cell culture conditions, HSF released low levels of PGE<sub>2</sub> and stimulation with IL-1 $\beta$  led to severalfold increase in PGE<sub>2</sub> production (Fig. 1). Pretreatment with increasing concentrations of the PPAR $\gamma$  ligands 15d-PGJ<sub>2</sub> or TRO suppressed IL-1 $\beta$ -induced PGE<sub>2</sub> production in a dose-dependent manner. Conversely, the selective PPAR $\alpha$  activator had no effect on IL-1 $\beta$ -induced PGE<sub>2</sub> production (Fig. 1).

To determine whether these changes in PGE<sub>2</sub> release were related to differences in amounts of mPGES-1, Western blotting of cell lysate protein was carried out. As expected, treatment with IL-1 $\beta$  resulted in a strong induction of mPGES-1 protein expression (16 kDa) (Fig.2 A-C). Interestingly, both PPAR $\gamma$  ligands, 15d-PGJ<sub>2</sub> and TRO suppressed IL-1 $\beta$ -induced mPGES-1 protein expression in a dose-dependent manner (Fig. 2A and 2B). By contrast, the PPAR $\alpha$ -specific activator, Wy14643, had no effect on IL-1 $\beta$ -induced mPGES-1 expression (Fig.2C). As shown in Fig. 2 (lower pannels), cPGES protein was constitutively expressed in HSF and its expression was not significantly altered by these treatments. These

results indicate that PPAR $\gamma$  ligands can inhibit IL-1 $\beta$ -induced mPGES-1 expression. The concentrations of 15d-PGJ<sub>2</sub> and TRO that inhibited IL-1 $\beta$ -induced mPGES-1 expression and PGE<sub>2</sub> production had no effect on cell viability as determined by Trypan blue exclusion and MTT assays (data not shown).

*Activation of PPAR $\gamma$  inhibits IL-1 $\beta$ -induced mPGES-1 expression at the transcriptional level*-To further elucidate the mechanism responsible for the changes in amounts of mPGES-1 protein, we measured the steady-state level of mPGES-1 mRNA by quantitative RT-PCR. Treatment with IL-1 $\beta$  (100 pg/ml) enhanced the expression of mPGES-1 mRNA (Fig. 3A). Both 15d-PGJ<sub>2</sub> and TRO dose-dependently suppressed IL-1 $\beta$ -induced mPGES-1 mRNA expression (Fig. 3A). In contrast, and in agreement with the data in Fig. 2C, the PPAR $\alpha$ -specific ligand Wy14643 had no significant effect on IL-1 $\beta$ -induced mPGES-1 mRNA expression (Fig. 3A). As expected, the level of cPGES mRNA was not altered as a consequence of treatment with IL-1 $\beta$  alone or in combination with either PPAR $\gamma$  ligands (Fig. 3B). Thus, the level of mPGES-1 and cPGES mRNA expression mirrors the pattern of their respective protein expression.

To determine whether the regulation of IL-1 $\beta$ -induced mPGES-1 mRNA by 15d-PGJ<sub>2</sub> and TRO occurred at the level of transcription, we carried out transient transfection studies. Synovial fibroblasts were transfected with a human mPGES-1 promoter (-538 to -28) region/ luciferase reporter gene construct and stimulated with IL-1 $\beta$  in the absence or presence of PPAR $\gamma$  ligands. As shown in Fig. 4, IL-1 $\beta$  increased the luciferase activity of the mPGES-1 promoter and this activation was

dose-dependently reduced by 15d-PGJ<sub>2</sub> (Fig. 4A). Similarly, treatment with TRO prevented IL-1 $\beta$ -mediated activation of the mPGES-1 promoter (Fig. 4B). Thus, PPAR $\gamma$  ligands suppress IL-1 $\beta$ -induced mPGES-1 promoter activity suggesting that PPAR $\gamma$  ligands exert their inhibitory effects on mPGES-1 expression through a transcriptional mechanism.

*Suppression of mPGES-1 expression by 15d-PGJ<sub>2</sub> and TRO is mediated by PPAR $\gamma$*

PPAR $\gamma$  ligands were reported to exert their transcriptional effects through PPAR $\gamma$ -dependent and -independent mechanisms (19). To evaluate the role of PPAR $\gamma$  in the suppressive effect of 15d-PGJ<sub>2</sub> and TRO on IL-1 $\beta$ -induced mPGES-1 expression, we performed additional transient transfection experiments using wild-type or dominant negative (DN) PPAR $\gamma$  expression plasmids. As shown in Fig. 5A, IL-1 $\beta$ -induced activation of the mPGES-1 promoter was reduced by 15d-PGJ<sub>2</sub> (5  $\mu$ M) (bar 2 versus bar 4) or TRO (10  $\mu$ M) (bar 2 versus bar 5). Cotransfection with an expression plasmid encoding PPAR $\gamma$  also reduced IL-1 $\beta$ -induced activation of the mPGES-1 promoter (bar 2 versus bar 3). Moreover, this effect was further enhanced with the addition of either 15d-PGJ<sub>2</sub> (bar 3 versus bar 6) or TRO (bar 3 versus bar 7). The possibility that PPAR $\gamma$  is involved in the repression of mPGES-1 was further tested using the PPAR $\gamma$  double mutant (L468A/E471A), which was reported to exert powerful inhibitory action on endogenous PPAR $\gamma$ . It contains mutations in the AF-2 ligand-dependent domain, resulting in a marked impairment of co-activator recruitment and transcriptional activation (30). The dominant negative activity of this construct was confirmed in transient transfection experiments using wild-type PPAR $\gamma$

and a luciferase reporter plasmid consisting of three copies of the PPAR-responsive element (PPRE) (data not shown). While overexpression of PPAR $\gamma$ -DN on its own had no significant effect on IL-1 $\beta$ -induced mPGES-1 promoter activation (bar 2 versus bar 3), it relieved the suppressive effects of both 15d-PGJ<sub>2</sub> (20  $\mu$ M) (bar 4 versus bar 6) and TRO (50  $\mu$ M) (bar 5 versus bar 7) (Fig. 5B), suggesting that the inhibition of IL-1 $\beta$ -induced mPGES-1 expression by 15d-PGJ<sub>2</sub> and TRO is mediated by PPAR $\gamma$ . To confirm the involvement of PPAR $\gamma$  in the suppressive effects of 15d-PGJ<sub>2</sub> and TRO on IL-1 $\beta$ -induced mPGES-1 expression, we examined the action of GW9662, a selective and irreversible PPAR $\gamma$  antagonist. HSF were preincubated with increasing concentrations of GW9662 (1, 5, and 10  $\mu$ M) for 30 min prior to the addition of 15d-PGJ<sub>2</sub> (20  $\mu$ M) or TRO (50  $\mu$ M) and were subsequently stimulated with IL-1 $\beta$  (100 pg/ml) for 18 h. Western blot analysis revealed that GW9662 dose-dependently relieved the suppressive effect of 15d-PGJ<sub>2</sub> (Fig. 6A) and TRO (Fig. 6B) on IL-1 $\beta$ -induced mPGES-1 protein expression. GW9662 on its own had no significant effect on mPGES-1 expression (Fig. 6, *last three lanes*). As expected the level of cPGES protein expression was not altered by these treatments (Fig. 6, *lower panels*). Taken together, these results suggest that 15d-PGJ<sub>2</sub> and TRO inhibit IL-1 $\beta$ -induced mPGES-1 expression at the transcriptional level in a PPAR $\gamma$ -dependent mechanism.

*PPAR $\gamma$  activation inhibits transcriptional activation by Egr-1*-The transcription factor Egr-1 had been shown to play a crucial role in the transcription of mPGES-1 (32, 33). Therefore, we investigated the effect of 15d-PGJ<sub>2</sub> and TRO on Egr-1-mediated

activation of mPGES-1 promoter. As shown in Fig. 7, the activity of the mPGES-1 promoter was enhanced by cotransfection with human Egr-1 expression plasmid (bar 1 versus bar 2). However the activation of the mPGES-1 promoter by Egr-1 was significantly attenuated by cotransfection with the human PPAR $\gamma$  expression plasmid (bar 2 versus bar 3). The activity of mPGES-1 promoter was also reduced by either 15d-PGJ<sub>2</sub> (5  $\mu$ M) (bar 2 versus bar 4) or TRO (10  $\mu$ M) (bar 2 versus bar 5). Moreover, the suppressive effect of PPAR $\gamma$  was further enhanced in the presence of 15d-PGJ<sub>2</sub> (bar 3 versus bar 6) or TRO (bar 3 versus bar 7).

Next, we sought to confirm that the inhibition of Egr-1 transcriptional activity is essential in the suppression of mPGES-1 by PPAR $\gamma$ . To this end, we analyzed the effect of PPAR $\gamma$  on the transcriptional activation of a synthetic luciferase reporter construct containing three tandem repeats of the putative Egr-1 binding sequence, pEgr-1x3-TK-Luc (31). As shown in Fig. 7B, overexpression of the human Egr-1 cDNA induced a robust increase in the transcriptional activity of the above construct (bar 1 versus bar 2). This activation was attenuated by cotransfection with the human PPAR $\gamma$  expression plasmid (bar 2 versus bar 3). 15d-PGJ<sub>2</sub> (bar 2 versus bar 4) and TRO (bar 2 versus bar 5) also reduced the transcriptional activity induced by Egr-1. Again, the suppressive effect of PPAR $\gamma$  was further enhanced in the presence of 15d-PGJ<sub>2</sub> (bar 3 versus bar 6) or TRO (bar 3 versus bar 7). Taken together, these data suggest that PPAR $\gamma$  activation inhibits mPGES-1 promoter activation by interfering with the Egr-1 transcriptional activity.

*PPAR $\gamma$  ligands inhibit Egr-1 binding activity-* Egr-1 has been shown to bind to the

GC box of the mPGES-1 promoter (32, 33). To establish whether IL-1 $\beta$  could induce binding of Egr-1 to the mPGES-1 promoter and whether this was altered by PPAR $\gamma$  ligands, we investigated the effect of 15d-PGJ<sub>2</sub> and TRO on the binding activity of Egr-1 using nuclear extracts from HSF and a radiolabeled oligonucleotide corresponding to the Egr-1 binding sites in the mPGES-1 promoter. As shown in Fig. 8A the binding of Egr-1 was strongly induced by IL-1 $\beta$  (lane 1 versus lane 2). When the cells were treated with 15d-PGJ<sub>2</sub> (lane 3-5) or TRO (lane 6-8) the formation of the Egr-1/DNA complex decreased in a dose-dependent manner. This binding was specific, as it could be completely abolished by coincubation with a 100-fold molar excess of unlabeled probe (lane 9). Coincubation, with a 100-fold molar excess of the mutant probe did not affect Egr-1 DNA binding activity (lane 10). The specificity of this interaction was further observed by the supershift assays, showing a further retardation in the electrophoretic mobility of the Egr-1/DNA complex in the presence of a specific anti-Egr-1 antibody (lane 11). These results suggest that PPAR $\gamma$  ligands inhibit IL-1 $\beta$ -induced mPGES-1 expression by reducing Egr-1 DNA binding activity to the promoter sequence.

To determine whether the reduction of Egr-1 DNA binding activity by PPAR $\gamma$  ligands in HSFs was due to inhibition of Egr-1 expression, we examined the effects of 15d-PGJ<sub>2</sub> and TRO on IL-1 $\beta$ -induced Egr-1 protein expression. The cells were pretreated with increasing concentrations of 15d-PGJ<sub>2</sub> or TRO prior to stimulation with IL-1 $\beta$ . In quiescent HSF, protein levels of Egr-1 were very low. Treatment with IL-1 $\beta$  (100 pg/ml) caused a robust induction of Egr-1. Interestingly, neither 15d-PGJ<sub>2</sub>

nor TRO altered IL-1 $\beta$ -induced Egr-1 (Fig. 8B). These data suggest that 15d-PGJ<sub>2</sub> and TRO are not general inhibitors of IL-1 $\beta$ -induced gene expression and that the inhibitory effect of PPAR $\gamma$  ligands on mPGES-1 expression does not involve inhibition of Egr-1 protein expression.

## DISCUSSION

An expanding body of evidence indicates that PPAR $\gamma$  and its ligands play an important role in the regulation of multiple inflammatory processes (24-26) (19, 27, 28). In the present study, we have extended these observations by showing that both natural and synthetic PPAR $\gamma$  ligands inhibit IL-1 $\beta$ -induced mPGES-1 expression in HSF. Furthermore, we elucidate the molecular mechanism underlying this effect. We demonstrate that this suppressive effect is transcriptional and PPAR $\gamma$ -dependent. Moreover, PPAR $\gamma$  activation inhibited the transcriptional and DNA binding activities of Egr-1. Taken together, our results reveal a novel function of PPAR $\gamma$ , further supporting its role in the control of inflammatory responses.

Several lines of evidence indicate that the inhibitory effects of 15d-PGJ<sub>2</sub> and TRO on IL-1 $\beta$ -induced mPGES-1 expression are likely to act through PPAR $\gamma$  activation. First, treatment with the specific PPAR $\alpha$  activator, Wy14653, had no effect on IL-1 $\beta$ -induced mPGES-1 expression. Second, overexpression of PPAR $\gamma$  suppressed transcriptional activation of the mPGES-1 promoter, which was enhanced by the addition of PPAR $\gamma$  ligands. Third, overexpression of a dominant negative form of PPAR $\gamma$  relieved the inhibitory effect of PPAR $\gamma$  ligands on the mPGES-1 activation. Finally, pretreatment with an irreversible pharmacological PPAR $\gamma$  antagonist, GW9662, overcame the inhibitory effect of PPAR $\gamma$  ligands on mPGES-1 protein expression. However, inhibition of PPAR $\gamma$  (via GW9662 or a DN), almost completely restored the suppressive effect of TRO, whereas the suppressive effect of 15d-PGJ<sub>2</sub> was only partially restored, suggesting that 15d-PGJ<sub>2</sub> can activate other PPAR $\gamma$ -



independent signaling pathways to inhibit mPGES-1 expression. In this context, several studies reported that 15d-PGJ<sub>2</sub> inhibits many inflammatory responses by mechanisms that are independent of PPAR $\gamma$ , such as the expression of iNOS in microglial cells and astrocytes (34), the beta2-integrin-dependent oxidative burst in human neutrophils (35) and the expression of CD95 ligand in T lymphocytes (36). In addition, it was demonstrated that 15d-PGJ<sub>2</sub> inhibits NF- $\kappa$ B signaling at different levels, including modification of I- $\kappa$ B kinase activity, which reduces the NF- $\kappa$ Bp65 nuclear translocation, and by direct modification of the DNA binding domain of NF- $\kappa$ Bp50 (37, 38). Finally, Chawla et al (39) examined inflammatory responses in macrophages derived from PPAR $\gamma$ <sup>-/-</sup> embryonic stem cells and reported that PPAR $\gamma$  ligands still repress LPS-induced iNOS and COX-2 expression. Elucidation of PPAR $\gamma$ -independent mechanisms of PPAR $\gamma$  ligands needs further studies.

The transcriptional induction of mPGES-1 is controlled primarily by Egr-1 through two Egr-1 binding motifs identified in the proximal promoter region of the mPGES-1 region (32, 33). We hypothesized that inhibition of Egr-1 activity by PPAR $\gamma$  could be the mechanism by which PPAR $\gamma$  exerts its repressive effect on mPGES-1 transcription. By using reporter gene assays, we found that Egr-1 indeed activated the mPGES-1 promoter, and this activation was reduced by cotransfection with an expression vector for PPAR $\gamma$ . Moreover, 15d-PGJ<sub>2</sub> and TRO inhibited Egr-1-mediated mPGES-1 promoter, and this inhibition was further enhanced in the presence of a PPAR $\gamma$  expression plasmid. PPAR $\gamma$  activation also inhibited Egr-1-induced activation of a synthetic luciferase reporter construct containing three tandem

repeats of Egr-1 motif, suggesting that PPAR $\gamma$  inhibits Egr-1 transcriptional activity in a promoter-independent manner. This is the first evidence that PPAR $\gamma$  activation inhibits Egr-1 transcriptional activity in HSF. In EMSA and supershift assays, we observed that PPAR $\gamma$  ligands reduced DNA binding of Egr-1 to a radiolabeled oligonucleotide corresponding to the Egr-1 binding sites in the mPGES-1 promoter. Altogether, these results strongly suggest that PPAR $\gamma$ -mediated repression of mPGES-1 results from decreased Egr-1 binding.

Several mechanisms can explain the repression of Egr-1 activities by PPAR $\gamma$ . One possibility is that PPAR $\gamma$  activation suppresses Egr-1 expression. Indeed, PPAR $\gamma$  ligands were reported to inhibit hypoxia-induced Egr-1 expression in mononuclear phagocytes (40). However, in our study, 15d-PGJ<sub>2</sub> and TRO had no effect on IL-1 $\beta$ -induced Egr-1 expression in HSF, suggesting that PPAR $\gamma$  ligands inhibit Egr-1 transcriptional and DNA binding activities in HSF by distinct mechanisms. A second mechanism could be competition between PPAR $\gamma$  and Egr-1 for binding to response elements. This possibility is probably unlikely as : i) EMSA analysis showed no binding of PPAR $\gamma$  to an oligonucleotide corresponding to the Egr-1 binding sites in the mPGES-1 promoter (data not shown); ii) The human mPGES-1 promoter construct used in this study contains no consensus PPRE sequence ; iii) PPAR $\gamma$  activation inhibited Egr-1 transcriptional activity in a promoter-independent manner. Alternatively, PPAR $\gamma$  may inhibit Egr-1 activity by directly binding to Egr-1 and inhibiting its DNA binding and/or transcriptional activity. In this context, PPAR $\gamma$  has been shown to inhibit NF- $\kappa$ B, NF-AT, and SP-1 transcriptional activity through

mechanisms that involve protein-protein interactions (26, 41, 42). Finally, PPAR $\gamma$  can attenuate Egr-1 activities by competing for general transcriptional co-activators such as CREB-binding protein (CBP/p300). CBP/p300 interacts with PPAR $\gamma$  and positively regulates PPAR $\gamma$ -dependent gene transcription (43, 44). Importantly, CBP/p300 also interacts with Egr-1 and enhances its transcriptional activity (45, 46). Thus, the sequestering of limiting amounts of CBP/p300 by activated PPAR $\gamma$  could account for the transcriptional repressive effect of PPAR $\gamma$  ligands on Egr-1 activities and mPGES-1 transcription. This is corroborated by our finding that overexpression of a PPAR $\gamma$  mutant lacking transcriptional co-activator recruitment activity overcomes the inhibitory effect of PPAR $\gamma$  ligands on mPGES-1 promoter activity.

In addition to Egr-1, the mPGES-1 promoter contains binding sites for transcription factors (AP-1 and SP-1) (32, 47) known to associate and/or to be down-regulated by PPAR $\gamma$  (24, 25, 42). Although the role of those elements in IL-1 $\beta$ -induced mPGES-1 transcription is still unknown, we can not exclude the possibility that PPAR $\gamma$  interaction with these transcription factors may be involved in the repression of mPGES-1 expression. The ability of PPAR $\gamma$  to repress Egr-1-mediated transcription may be of relevance for other inflammatory genes. Indeed, and as stated above, PPAR $\gamma$  ligands were reported to inhibit the expression of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-2 and several chemokines. Interestingly, Egr-1 activation is involved in the transcriptional activation of these genes (48-50). Therefore, it is possible that PPAR $\gamma$ -mediated Egr-1 repression may be part of the mechanisms by which PPAR $\gamma$  down-regulates these genes. Moreover, it was recently reported that Egr-1 positively

regulates expression of PPAR $\gamma$ . This is consistent with the suggestion that upregulation of PPAR $\gamma$  expression by Egr-1 may constitute a negative feedback mechanism by which Egr-1 inhibits expression and/or signaling pathways of pro-inflammatory mediators.

Several studies demonstrated that PPAR $\gamma$  ligands attenuate inflammation *in vivo* in animal models of experimental allergic encephalomyelitis (51), inflammatory bowel disease (52), lupus nephritis (53), atherosclerosis (54), and arthritis (55, 56). Thus, inhibition of mPGES-1 could be part of mechanisms by which PPAR $\gamma$  inhibit inflammatory responses *in vivo*. In addition to inflammation, increased expression of mPGES-1 may have important consequences in other pathological conditions. For instance, increased expression of mPGES-1 has been described in symptomatic atherosclerotic plaques, and various carcinoma and cancer cell lines (14-18). PPAR $\gamma$  ligands may therefore have clinical application not only in chronic inflammatory conditions but neoplastic diseases as well.

In conclusion, we show for the first time that PPAR $\gamma$  activation suppresses mPGES-1 expression via negative interference with Egr-1. This novel function of PPAR $\gamma$  ligands further supports the role of PPAR $\gamma$  in inflammation and suggests that the modulation of this gene expression by PPAR $\gamma$  ligands may constitute an additional therapeutic tool to take into account for the treatment and/or prevention of inflammatory and neoplastic diseases.

## REFERENCES

1. Crosby CG, DuBois RN. (2003) *Expert Opin Emerg Drugs* . **8**, 1-7.
2. Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H. (2003) *Semin Arthritis Rheum* . **33**, 155-167.
3. Smith WL, Langenbach R. (2001) *J Clin Invest* . **107**, 1491-1495.
4. Jakobsson PJ, Thoren S, Morgenstern R, Samuelsson B. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* . **96**, 7220-7225.
5. Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, Kojima F, Ikeda T, Fueki M, Ueno A, Oh S, Kudo I. (2000) *J Biol Chem* . **275**, 32783-32792.
6. Murakami M, Nakashima K, Kamei D, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, Ohmiya Y, Watanabe K, Kudo I. (2003) *J Biol Chem* . **278**, 37937-37947.
7. Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M, Kudo I. (2000) *J Biol Chem* . **275**, 32775-32782.
8. Tanioka T, Nakatani Y, Kobayashi T, Tsujimoto M, Oh-ishi S, Murakami M, Kudo I. (2003) *Biochem Biophys Res Commun* . **303**, 1018-1023.
9. Claveau D, Sirinyan M, Guay J, Gordon R, Chan CC, Bureau Y, Riendeau D, Mancini JA. (2003) *J Immunol* . **170**, 4738-4744.
10. Uematsu S, Matsumoto M, Takeda K, Akira S. (2002) *J Immunol* . **168**, 5811-5816.
11. Trebino CE, Stock JL, Gibbons CP, Naiman BM, Wachtmann TS, Umland JP, Pandher K, Lapointe JM, Saha S, Roach ML, Carter D, Thomas NA, Durtschi BA, McNeish JD, Hambor JE, Jakobsson PJ, Carty TJ, Perez JR, Audoly LP. (2003) *Proc Natl Acad Sci U S A* . **100**, 9044-9049.
12. Stichtenoth DO, Thoren S, Bian H, Peters-Golden M, Jakobsson PJ, Crofford LJ. (2001) *J Immunol* . **167**, 469-474.

13. Han R, Tsui S, Smith TJ. (2002) *J Biol Chem* . **277**, 16355-16364.
14. Cipollone F, Prontera C, Pini B, Marini M, Fazia M, De Cesare D, Iezzi A, Uccchino S, Boccoli G, Saba V, Chiarelli F, Cuccurullo F, Mezzetti A. (2001) *Circulation* . **104**, 921-927.
15. Jabbour HN, Milne SA, Williams AR, Anderson RA, Boddy SC. (2001) *Br J Cancer* . **85**, 1023-1031.
16. Yoshimatsu K, Altorki NK, Golijanin D, Zhang F, Jakobsson PJ, Dannenberg AJ, Subbaramaiah K. (2001) *Clin Cancer Res* . **7**, 2669-2674.
17. Cohen EG, Almahmeed T, Du B, Golijanin D, Boyle JO, Soslow RA, Subbaramaiah K, Dannenberg AJ. (2003) *Clin Cancer Res* . **9**, 3425-3430.
18. van Rees BP, Sivula A, Thoren S, Yokozaki H, Jakobsson PJ, Offerhaus GJ, Ristimaki A. (2003) *Int J Cancer* . **107**, 551-556.
19. Fahmi, H., Pelletier, J. P., and Martel-Pelletier, J. (2002) *J Rheumatol* . **29**, 3-14.
20. Staels B, Koenig W, Habib A, Merval R, Lebret M, Torra IP, Delerive P, Fadel A, Chinetti G, Fruchart JC, Najib J, Macclouf J, Tedgui A. (1998) *Nature* . **393**, 790-793.
21. Cunard R, Ricote M, DiCampi D, Archer DC, Kahn DA, Glass CK, Kelly CJ. (2002) *J Immunol* . **168**, 2795-2802.
22. Jones DC, Ding X, Zhang TY, Daynes RA. (2003) *J Immunol* . **171**, 196-203.
23. Devchand PR, Keller H, Peters JM, Vazquez M, Gonzalez FJ, Wahli W. (1996) *Nature* . **384**, 39-43.
24. Ricote, M., Li, A. C., Willson, T. M., Kelly, C. J., and Glass, C. K. (1998) *Nature* . **391**, 79-82.
25. Jiang C, Ting AT, Seed B. (1998) *Nature* . **391**, 82-86.
26. Yang, X. Y., Wang, L. H., Chen, T., Hodge, D. R., Resau, J. H., DaSilva, L., and Farrar, W. L. (2000) *J Biol Chem* . **275**, 4541-4544.

27. Fahmi H, Di Battista JA, Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, Martel-Pelletier J. (2001) *Arthritis Rheum* . **44**, 595-607.
28. Fahmi, H., Pelletier, J. P., Di Battista, J. A., Cheung, H. S., Fernandes, J., and Martel-Pelletier, J. (2002) *Osteoarthritis Cartilage* . **10**, 100-108.
29. Altman RD. (1991) *Semin Arthritis Rheum* . **20**, 40-47.
30. Gurnell M, Wentworth JM, Agostini M, Adams M, Collingwood TN, Provenzano C, Browne PO, Rajanayagam O, Burris TP, Schwabe JW, Lazar MA, Chatterjee VK. (2000) *J Biol Chem* . **275**, 5754-5759.
31. Fu M, Zhang J, Lin Y, Zhu X, Ehrenguber MU, Chen YE. (2002) *J Biol Chem* . **277**, 26808-26814.
32. Naraba H, Yokoyama C, Tago N, Murakami M, Kudo I, Fueki M, Oh-Ishi S, Tanabe T. (2002) *J Biol Chem* . **277**, 28601-28608.
33. Subbaramaiah K, Yoshimatsu K, Scherl E, Das KM, Glazier KD, Golijanin D, Soslow RA, Tanabe T, Naraba H, Dannenberg AJ. (2004) *J Biol Chem* . **279**, 12647-12658.
34. Petrova, T. V., Akama, K. T., and Van Eldik, L. J. (1999) *Proc Natl Acad Sci U S A* . **96**, 4668-4673.
35. Vaidya, S., Somers, E. P., Wright, S. D., Detmers, P. A., and Bansal, V. S. (1999) *J Immunol* . **163**, 6187-6192.
36. Cippitelli M, Fionda C, Di Bona D, Lupo A, Piccoli M, Frati L, Santoni A. (2003) *J Immunol* . **170**, 4578-4592.
37. Straus, D. S., Pascual, G., Li, M., Welch, J. S., Ricote, M., Hsiang, C. H., Sengchanthalangsy, L. L., Ghosh, G., and Glass, C. K. (2000) *Proc Natl Acad Sci U S A* . **97**, 4844-4849.
38. Cernuda-Morollon E, Pineda-Molina E, Canada FJ, Perez-Sala D. (2001) *J Biol Chem* . **276**, 35530-35536.
39. Chawla, A., Barak, Y., Nagy, L., Liao, D., Tontonoz, P., and Evans, R. M. (2001) *Nat Med* . **7**, 48-52.

40. Okada M, Yan SF, Pinsky DJ. (2002) *FASEB J* . **16**, 1861-1868.
41. Chen F, Wang M, O'Connor JP, He M, Tripathi T, Harrison LE. (2003) *J Cell Biochem* . **90**, 732-744.
42. Sugawara A, Uruno A, Kudo M, Ikeda Y, Sato K, Taniyama Y, Ito S, Takeuchi K. (2002) *J Biol Chem* . **277**, 9676-9683.
43. Qi C, Surapureddi S, Zhu YJ, Yu S, Kashireddy P, Rao MS, Reddy JK. (2003) *J Biol Chem* . **278**, 25281-25284.
44. Koder Y, Takeyama K, Murayama A, Suzawa M, Masuhiro Y, Kato S. (2000) *J Biol Chem* . **275**, 33201-33204.
45. Barthel R, Tsytsykova AV, Barczak AK, Tsai EY, Dascher CC, Brenner MB, Goldfeld AE. (2003) *Mol Cell Biol* . **23**, 526-533.
46. Silverman ES, Du J, Williams AJ, Wadgaonkar R, Drazen JM, Collins T. (1998) *Biochem J* . **336** ( Pt 1), 183-189.
47. Ekstrom L, Lyrenas L, Jakobsson PJ, Morgenstern R, Kelner MJ. (2003) *Biochim Biophys Acta* . **1627**, 79-84.
48. Yan SF, Fujita T, Lu J, Okada K, Shan Zou Y, Mackman N, Pinsky DJ, Stern DM. (2000) *Nat Med* . **6**, 1355-1361.
49. Yao J, Mackman N, Edgington TS, Fan ST. (1997) *J Biol Chem* . **272**, 17795-17801.
50. Skerka C, Decker EL, Zipfel PF. (1995) *J Biol Chem* . **270**, 22500-22506.
51. Diab A, Deng C, Smith JD, Hussain RZ, Phanavanh B, Lovett-Racke AE, Drew PD, Racke MK. (2002) *J Immunol* . **168**, 2508-2515.
52. Su CG, Wen X, Bailey ST, Jiang W, Rangwala SM, Keilbaugh SA, Flanigan A, Murthy S, Lazar MA, Wu GD. (1999) *J Clin Invest* . **104**, 383-389.
53. Reilly CM, Oates JC, Cook JA, Morrow JD, Halushka PV, Gilkeson GS. (2000) *J Immunol* . **164**, 1498-1504.



54. Li AC, Brown KK, Silvestre MJ, Willson TM, Palinski W, Glass CK. (2000) *J Clin Invest* . **106**, 523-531.
55. Kawahito Y, Kondo M, Tsubouchi Y, Hashiramoto A, Bishop-Bailey D, Inoue K, Kohno M, Yamada R, Hla T, Sano H. (2000) *J Clin Invest* . **106**, 189-197.
56. Cuzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Patel NS, Serraino I, Di Paola R, Genovese T, Britti D, De Maio M, Caputi AP, Thiemermann C. (2003) *Arthritis Rheum* . **48**, 3544-3556.

## FOOTNOTES

\*This work was supported by the Canadian Institutes of Health Research (CIHR) Grant IMH-63168, the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ) “Subvention d’Établissement de Jeune Chercheur # JC2836 ” and the Fonds de la Recherche du Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l’Université de Montréal (CHUM). §A Research Scholar of FRSQ.

<sup>1</sup>The abbreviations used are : 15d-PGJ<sub>2</sub>, 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -prostaglandin J<sub>2</sub>; COX, cyclooxygenase; cPGES, cytosolic prostaglandin E synthase; EMSA, electrophoretic mobility shift assay; HSF, human synovial fibroblasts; IL, interleukin; iNOS, inducible nitric oxide synthase; PG, prostaglandin; MMP, metalloproteinase; mPGES, membrane-associated prostaglandin E synthase; PCR, polymerase chain reaction; PPAR, peroxisome proliferator-activated receptor; RT, reverse transcription; TRO, troglitazone.

Acknowledgements : We thank T. J. Smith for the mPGES-I promoter; K. K. Chatterjee for WT and DN PPAR $\gamma$  expression plasmids ; Y. E. Chen for Egr-1 expression and reporter plasmids; and G. Tardif and F. Mineau for helpful suggestions. We are also grateful to F. C. Jolicoeur and C. S. Geng for their technical assistance.

## FIGURE LEGENDS

### Figure 1. **Effect of PPAR agonists on IL-1 $\beta$ -induced PGE<sub>2</sub> production in HSF.**

Confluent HSF were treated with increasing concentrations of 15d-PGJ<sub>2</sub>, TRO or Wy14643 for 30 min before incubation in the absence or the presence of 100 pg/ml IL-1 $\beta$  for 18 h. The culture media were collected and PGE<sub>2</sub> production was determined. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM from four independent experiments.

\*,  $p < 0.05$  compared with cells treated with IL-1 $\beta$  alone (control).

### Fig. 2. **Effect of PPAR agonists on IL-1 $\beta$ -induced mPGES-1 protein expression**

**in HSF.** Confluent HSF were treated with increasing concentrations of 15d-PGJ<sub>2</sub> (A), TRO (B) or Wy14643 (C) for 30 min before incubation in the absence or the presence of 100 pg/ml IL-1 $\beta$  for 18 h. Cell lysates were prepared and analyzed for mPGES-1 protein by Western blotting. In the *middle panel*, the blots were stripped and reprobed with a specific anti- $\beta$ -actin antibody. The expression of cPGES was also analyzed (*lower panel*). These blots are representative of similar results obtained from four independent experiments.

### Fig. 3. **Effect of PPAR agonists on IL-1 $\beta$ -induced mPGES-1 mRNA expression**

**in HSF.** Confluent HSF were treated with increasing concentrations of 15d-PGJ<sub>2</sub>, TRO or Wy14643 for 30 min before incubation in the absence or the presence of 100

pg/ml IL-1 $\beta$  for 12 h. Total RNA was isolated; cDNA was synthesized; and mPGES-1, cPGES and GAPDH mRNAs were quantified using real-time quantitative PCR. The results are expressed as -fold changes, considering 1 as the value of untreated cells. All experiments were performed in triplicate, and negative controls without template RNA were included in each experiment. The results are the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. \*,  $p < 0.05$ ; compared with cells treated with IL-1 $\beta$  alone (control).

**Fig. 4. 15d-PGJ<sub>2</sub> and TRO inhibit the transcriptional activity of mPGES-1 promoter.** HSF were cotransfected with 1  $\mu$ g/well of the human mPGES-1 promoter (-538/-28) construct ligated to luciferase and 0.5  $\mu$ g of the internal control pSV40- $\beta$ -galactosidase, using FuGene 6 transfection reagent. The next day, transfected cells were incubated with increasing concentrations of 15d-PGJ<sub>2</sub> (A) or TRO (B) in the absence or presence of IL-1 $\beta$  (100 pg/ml) for 14 h. Luciferase activity values were determined on cell extracts and normalized to  $\beta$ -galactosidase activity. Results are expressed as -fold induction, considering 1 as the value of unstimulated cells, and represent the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. \*,  $p < 0.05$ ; compared with cells treated with IL-1 $\beta$  alone (control).

**Fig. 5. Effect of PPAR $\gamma$  and dominant negative PPAR $\gamma$  on 15d-PGJ<sub>2</sub>- and TRO-mediated suppression of mPGES-1 promoter activity.** HSF were cotransfected with the mPGES-1 promoter (1  $\mu$ g/well), the internal control pSV40- $\beta$ -galactosidase

(0.5  $\mu$ g/well), and 0.5  $\mu$ g of vectors expressing PPAR $\gamma$  (A) or DN-PPAR $\gamma$  (B). The total amount of transfected DNA was kept constant by addition of empty vector. The next day, cells were treated with the indicated concentration of 15d-PGJ<sub>2</sub> or TRO in the absence or presence of 100 pg/ml IL-1 $\beta$  for 14 h. Luciferase activity values were determined on cell extracts and normalized to  $\beta$ -galactosidase activity. Results are expressed as -fold induction, considering 1 as the value of unstimulated cells and represent the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. \*,  $p < 0.05$ ; compared with cells treated with IL-1 $\beta$  alone (control).

**Fig. 6. PPAR $\gamma$  antagonist (GW9662) alleviates the suppressive effect of 15d-PGJ<sub>2</sub> and TRO on IL-1 $\beta$ -induced mPGES-1 expression.** Confluent HSF were pretreated with increasing concentrations of GW9662 for 30 min. Then, the cells were treated with or without IL-1 $\beta$  (100 pg/ml) for 18 h in the absence or the presence of 20  $\mu$ M 15d-PGJ<sub>2</sub> (A) or 50  $\mu$ M TRO (B). Cell lysates were prepared and analyzed for mPGES-1 protein by Western blotting as described under Materials and Methods. In the *lower panel*, the blots were stripped and reprobed with a specific anti- $\beta$ -actin antibody. These blots are representative of similar results obtained from four independent experiments.

**Fig. 7. PPAR $\gamma$  ligands inhibit mPGES-1 gene transcription by interfering with promoter transactivation by Egr-1.** HSF were cotransfected with mPGES-1-Luc (A) or p3xEgr-1-Luc (B) and an expression plasmid for Egr-1 with or without PPAR $\gamma$ .

The total amount of transfected DNA was kept constant by addition of empty vector. The next day, the cells incubated with the indicated concentration of 15d-PGJ<sub>2</sub> or TRO for 14 h. Luciferase activity values were determined on cell extracts and normalized to  $\beta$ -galactosidase activity. Results are expressed as -fold induction, considering 1 as the value of cells transfected with the reporter construct alone, and represent the mean  $\pm$  SEM of four independent experiments. \*,  $p < 0.05$ ; compared with cells transfected with Egr-1 alone (control).

**Fig. 8. PPAR $\gamma$  ligands inhibit DNA binding activity of Egr-1.** A, confluent HSF were pretreated with increasing concentrations of 15d-PGJ<sub>2</sub> or TRO for 4 h, followed by the addition of IL-1 $\beta$  (100 pg/ml) for 1 h. Nuclear extracts (5  $\mu$ g) were incubated with a <sup>32</sup>P-labeled oligonucleotide containing the two Egr-1 binding sites of the mPGES-1 promoter. Specificity of binding was confirmed using 100-fold molar excess of unlabeled oligonucleotides containing wild type (wt) or mutated (mt) Egr-1 binding sites. Positions of Egr-1/DNA complex (Egr-1), nonspecific binding (NS) and supershifted band (SS) are indicated. A representative result of 4 independent experiments is shown. B, Confluent HSF were treated with increasing concentrations of 15d-PGJ<sub>2</sub> or TRO for 4 h, followed by the addition of IL-1 $\beta$  (100 pg/ml) for 1 h. Nuclear extracts were prepared and analyzed for Egr-1 protein by Western blotting. This blot is representative of similar results obtained from 3 independent experiments.

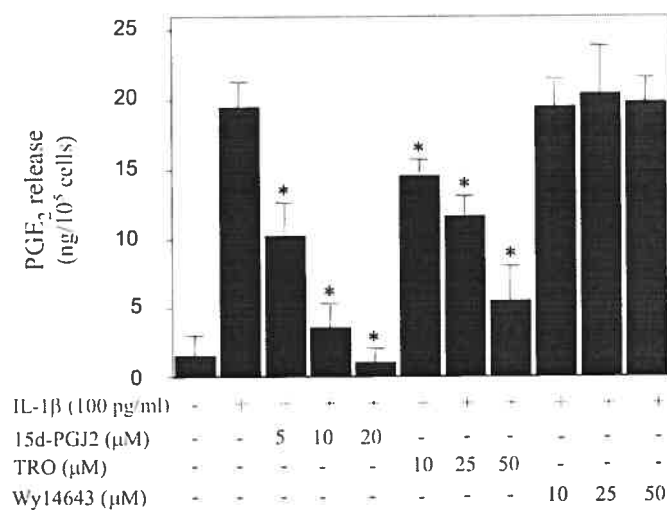
Figure 1, Cheng *et al.*

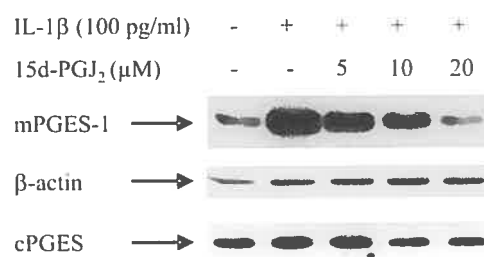
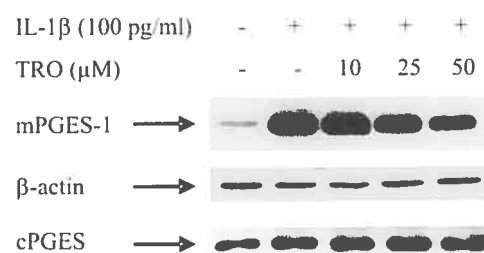
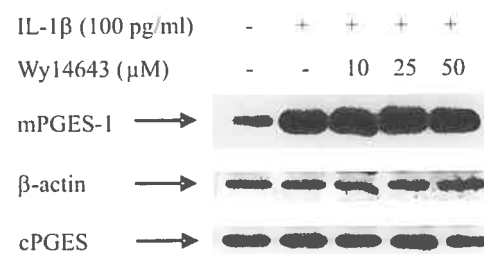
Figure 2, Cheng *et al.***A****B****C**



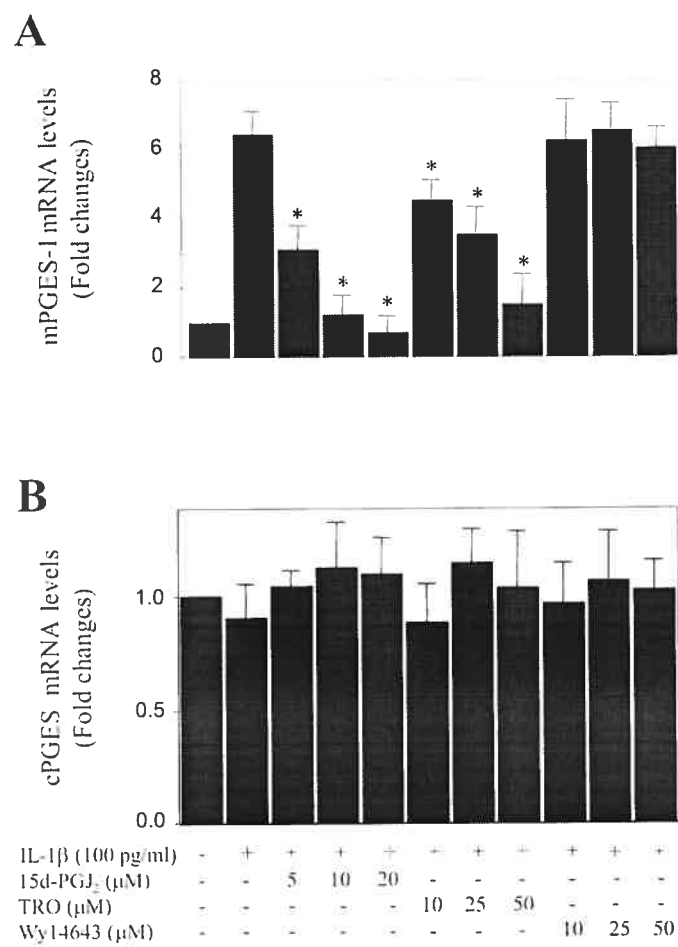
Figure 3, Cheng *et al.*

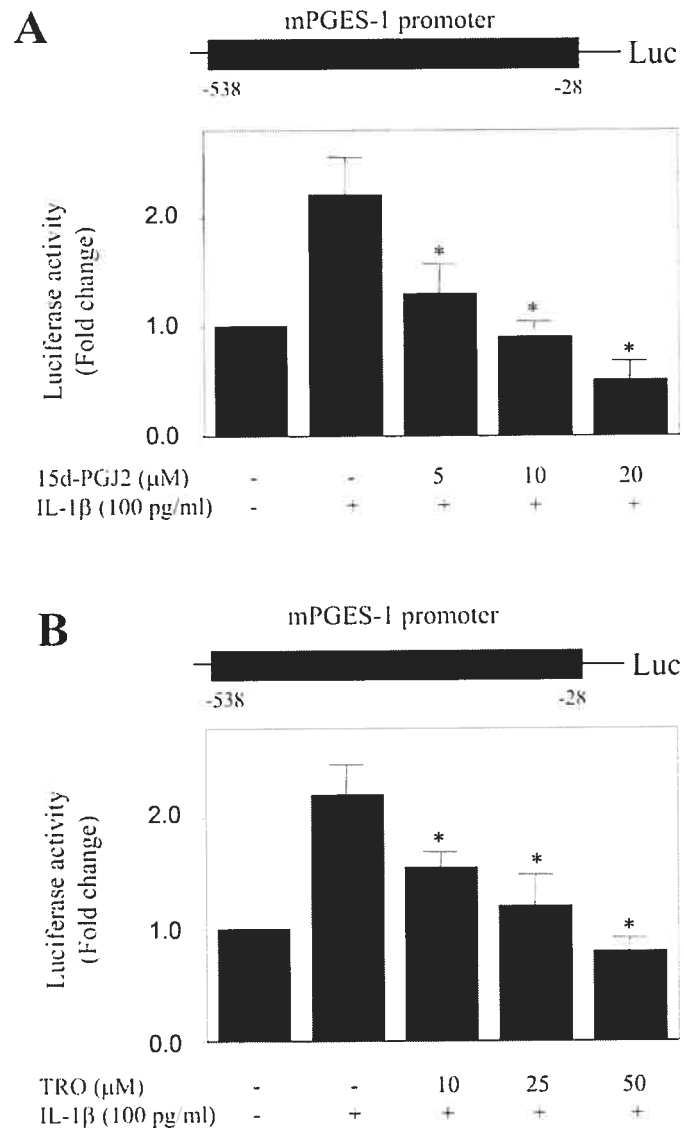
Figure 4, Cheng *et al.*

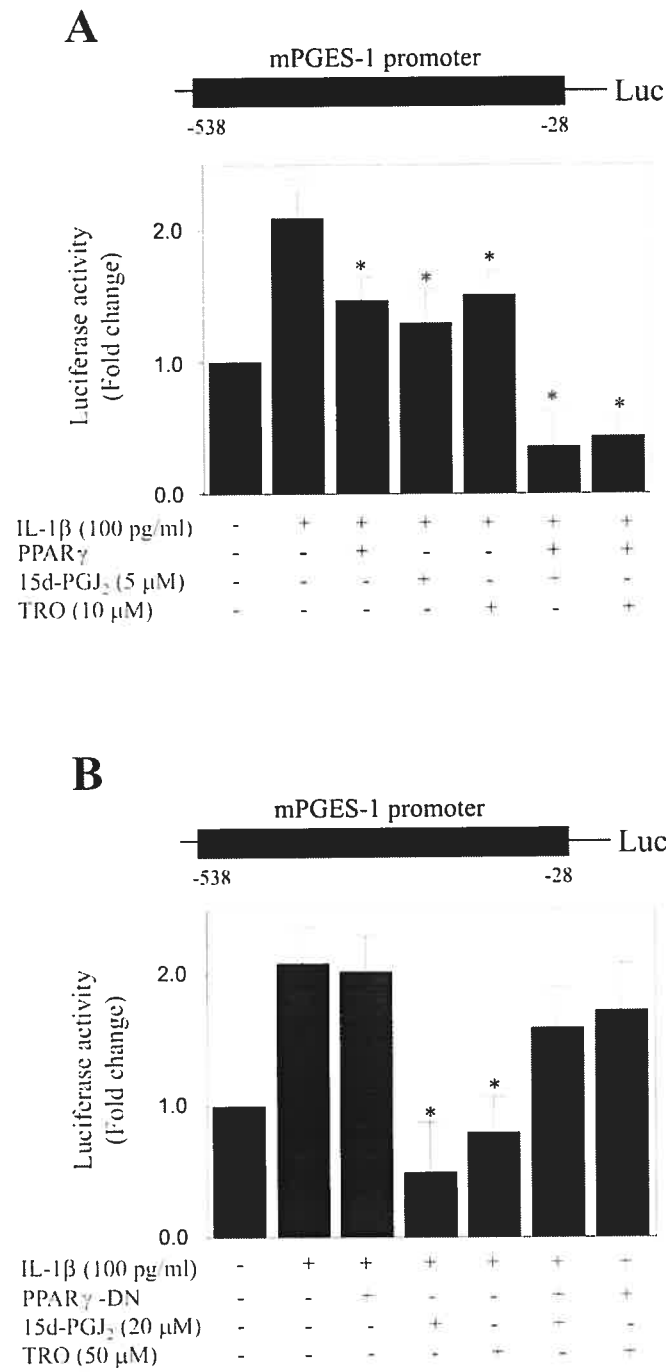
Figure 5, Cheng *et al.*

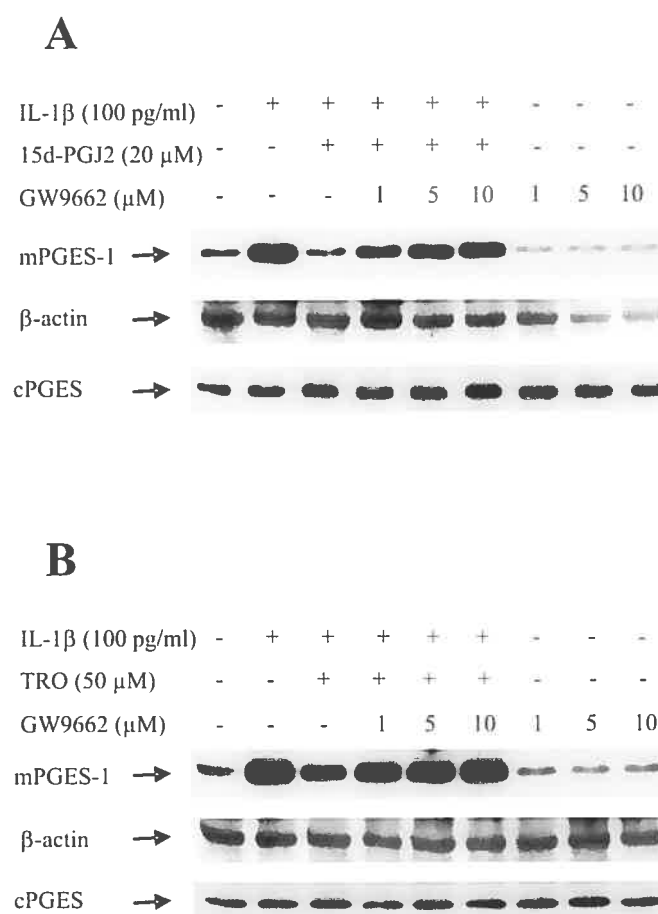
Figure 6, Cheng *et al.*

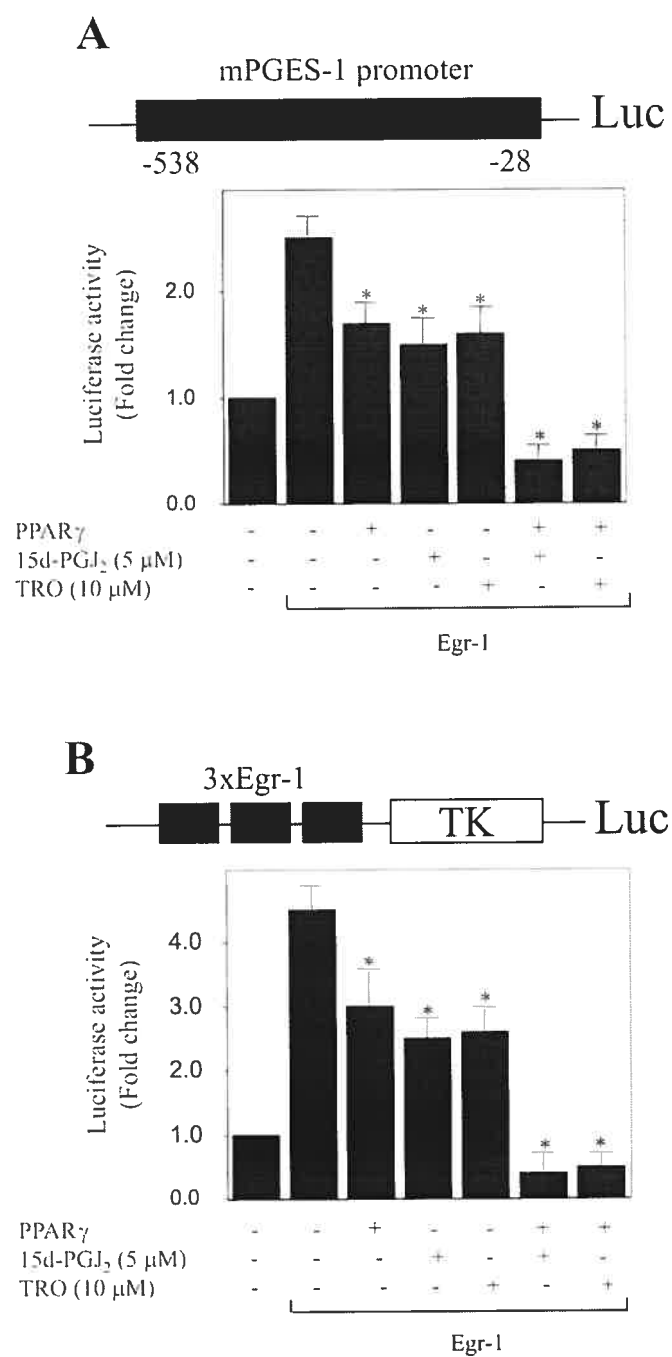
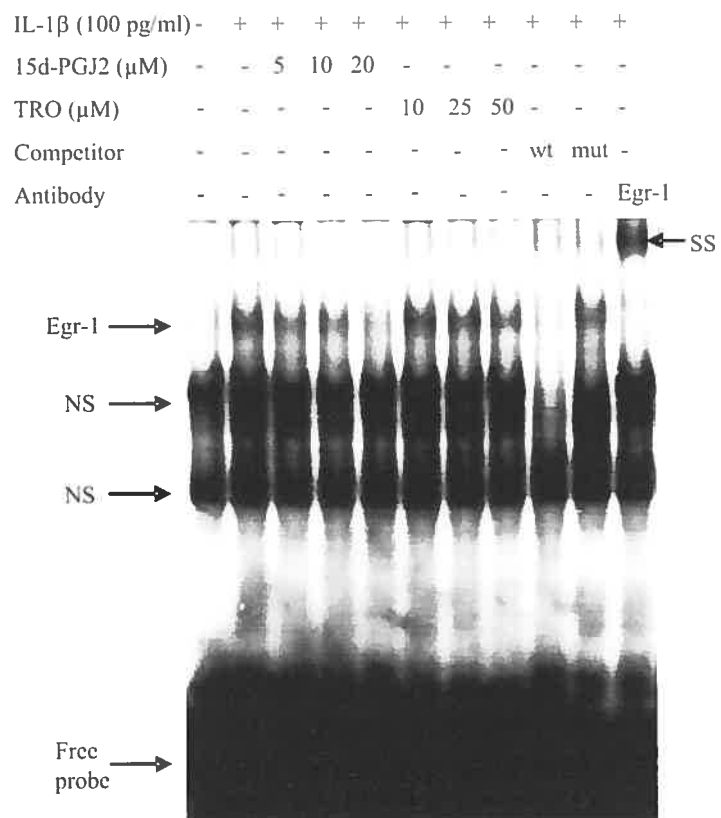
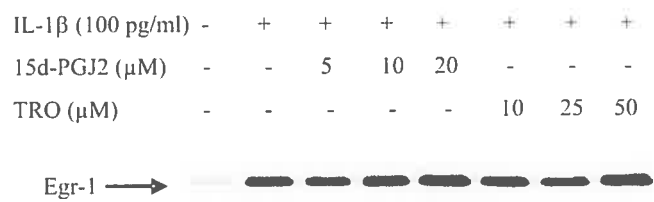
Figure 7, Cheng *et al.*

Figure 8, Cheng *et al.***A****B**

**Association of Polymorphisms in the Peroxisome Proliferator-Activated  
Receptor- $\gamma$  Gene and Osteoarthritis of the Knee**

Saranette Cheng<sup>1</sup>, Johanne Martel-Pelletier<sup>1</sup>, Jean-Pierre Pelletier<sup>1</sup>, and Hassan Fahmi<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Osteoarthritis Research Unit, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM), Department of Medicine, Notre-Dame Hospital, Montreal.

Correspondence: Hassan Fahmi,  
Osteoarthritis Research Unit, Notre Dame-Hospital, CR-  
CHUM  
1560 Sherbrooke East, Pavilion DeSève, Y-2628  
Montreal, QC, H2L 4M1. Canada  
Fax: + 1 514 412 7583  
E-mail: [REDACTED]

Tables: 4

Running title: PPAR $\gamma$  polymorphisms in OA

Keywords: Osteoarthritis, PPAR $\gamma$ , polymorphism, susceptibility, severity.

**Abstract**

**Objectives:** To study the association between two common polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) gene and susceptibility to, and severity of, osteoarthritis (OA) in a French-Canadian population.

**Methods:** Genomic DNA was obtained from 172 patients with OA and 210 ethnically matched healthy controls. Genotyping for the PPAR $\gamma$  gene polymorphisms (Pro12Ala and C1431T) was performed using polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism. The standard Kellgren/Lawrence (K/L) grading score and the French version of the Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index (WOMAC) were used to assess the radiological and functional severity of the disease. Estimated haplotypes were generated using the expectation maximization algorithm. Genotype and allele frequencies were compared between cases and controls using the  $\chi^2$  test.

**Results:** Genotype and allele frequencies for either polymorphism in the PPAR $\gamma$  gene were not significantly different between OA patients and controls. Moreover, no significant differences were observed after stratification of patients according to age at disease onset, radiographic or functional severity. Similarly, haplotype analysis of both polymorphisms in the PPAR $\gamma$  gene showed no association of any haplotype with susceptibility to, or severity of, OA.

**Conclusion:**

Our findings suggest that the examined polymorphisms in the PPAR $\gamma$  gene do not contribute significantly to susceptibility to, or severity, of OA in French-Canadian.



## Introduction

Osteoarthritis (OA) is the most common form of arthritis and is a leading cause of disability in developed countries and throughout the world (1). Knee OA is accompanied by pain, stiffness, and loss of function. Pathologically, it is characterized by synovial inflammation and progressive degeneration of articular cartilage. These processes are thought to be largely mediated through excess production of proinflammatory mediators, including, interleukin-1 $\beta$ , (IL-1 $\beta$ ), nitric oxide (NO), prostaglandin E2 (PGE2) and matrix metalloproteinases (MMPs) (2, 3). Although the etiology and the pathogenesis of OA are unknown, epidemiological and genetic studies have demonstrated that genetic factors are strong determinants in OA (4-6). Therefore, identifying susceptibility genes is a promising approach to understand the molecular basis and the pathogenesis of OA. Population-based association and genetic linkage studies have identified a number of candidate genes including type I collagen (COL1A1) (7), COL2A1 (8), aggrecan (9), estrogen receptor  $\alpha$  (10, 11), vitamin D receptor (7) IL-4 (12), and the IL-1 gene cluster (13, 14).

The peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) is a nuclear hormone receptor that acts as an important regulator of adipocyte differentiation and lipid and glucose metabolism. It is expressed predominately in adipose tissue, spleen, and large colon (15-17). Previous studies showed that PPAR $\gamma$  is also expressed in articular cartilage, and that PPAR $\gamma$  may have protective effects in OA. PPAR $\gamma$  activation prevents the expression of a number of genes involved in the pathogenesis

of OA, including, IL-1 $\beta$ , the inducible NO synthase (iNOS), cyclooxygenase-2 (COX-2) and microsomal prostaglandin E synthase-1 (mPGES-1) (18-23). PPAR $\gamma$  activation also appear to be chondroprotective by negatively regulating the expression of MMP-1 and MMP-13 and by preventing proteoglycan degradation (18, 19, 24). In addition, treatment with the synthetic PPAR $\gamma$  activator, pioglitazone, shows beneficial effects in an experimental model of OA (25). These data suggest that PPAR $\gamma$  could be a candidate gene for susceptibility to OA. Several genetic variants in the PPAR $\gamma$  gene have been described, the most prevalent being Pro12Ala and C161T (26). The Pro12Ala polymorphism results from a CCA-to-GCA missense mutation in codon 12 of exon B of the PPAR $\gamma$  gene. Since this mutation is located in the ligand-independent activation domain of the protein (27), it may cause conformational changes, and consequently affect its activity. The Pro12Ala polymorphism has been associated with improved insulin sensitivity (27, 28), reduced risk of type 2 diabetes (29), myocardial infarction (30), and atherosclerosis (31). The silent C1431T (also referred to as C161T) polymorphism in exon 6 has been associated with increased plasma level of leptin (32), reduced risk of coronary artery disease (33), and survival in immunoglobulin A nephropathy (34).

Since PPAR $\gamma$  displays anti-inflammatory and chondroprotective properties, it is reasonable to speculate that polymorphisms within this gene could influence susceptibility to, or severity of, OA. Therefore, we conducted a case-controlled study to evaluate whether the Pro12Ala and C161T polymorphisms are related to OA in a French Canadian population.

## **SUBJECTS AND METHODS**

### **Subjects**

One hundred and seventy-two knee OA patients were recruited from the outpatient Rheumatology Clinic at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (Montreal, Quebec, Canada). All patients were symptomatic and were treated on a regular basis. Patients with auto-immunes diseases, patellofemoral OA or with OA secondary to other conditions (including inflammation, sepsis, metabolic abnormalities, and trauma) were excluded. Control subjects were recruited from outpatient clinics at the Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. Eligible participants were unrelated individuals, aged 55 years, and older and who had no histories of arthritis, knee trauma or pain (35). All cases and controls were French Canadians who lived in or around Montreal. This study was approved by the ethical committees of Notre-Dame Hospital, and written informed consent was obtained from each participant.

### **Assessment of OA**

Knee OA was assessed by physical examination and confirmed by radiographs. For each patient, anteroposterior weight-bearing x-rays of the knees were taken and graded on a 5-point scale (0-4) according to Kellgren and Lawrence (5). Radiographic findings of OA were classified into mild (Kellgren-Lawrence grade 1 or 2) or severe (Kellgren-Lawrence grade 3 or 4). Patients were also evaluated for functional severity using the Western Ontario and McMaster University Osteoarthritis Index (WOMAC) (36), a validated disease-specific questionnaire addressing the severity of joint pain (5 questions), stiffness (2 questions) and physical functioning (17 questions). The visual analog scale (VAS; 0 = best, 100 = worse) version of the index was used, with the

patient assessing each question on a 100 mm VAS. The total WOMAC index was calculated by the summation of all 24 components, with 2400 mm being the worst possible score.

### **Genotyping and analysis of PPAR $\gamma$ polymorphisms**

Genomic DNA was prepared from whole blood samples using QIAmp DNA blood Midi Kits (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) according to the manufacturer's recommended protocol. Analysis of PPAR $\gamma$  gene polymorphisms was performed using polymerase chain reaction (PCR) and restriction fragment length polymorphism (RFLP). All reactions were performed in a Biometra Uno II Thermocycler (Biotech Inc, Montreal, QC, Canada) in a total volume of 50  $\mu$ l, containing 100 ng DNA, 50 mM KCl, 20 mM Tris HCl (pH 8.4), 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 200  $\mu$ M of each dNTP, 0.2  $\mu$ M of each primer, and 1 unit of Taq DNA polymerase. Samples were subjected to denaturation at 94°C for 5 min, followed by 31 amplification cycles (15 s at 95°C for denaturation, and 1 min for annealing and extension at 60°C). This was followed by final extension at 72°C for 10 min. The PCR products were digested with restriction enzymes according to the recommendations of the enzyme supplier. The fragments were separated by electrophoresis on 3% agarose gel and ethidium bromide-stained. For the Pro12Ala polymorphism in exon 2, the sense and anti-sense primers were 5'-GCCAATTCAAGCCCAGTC-3' and 5'-GATATGTTTGCAGACAGTGTATCAGTGAAGGAATCGCTTTCCG-3', respectively. The 270-bp PCR products were digested with BstU-I prior to electrophoresis. The genotypes were determined as follow: a single 270 bp fragment

for the Pro12Pro (CC) genotype, two fragments of 227 and 43 bp for Ala12Ala (GG) genotype, and three fragments of 270, 227 and 43 bp for Pro12Ala (CG) genotype.

For the C1431T polymorphism in exon 6, the forward and reverse primers were 5'-AGGTTTGCTGAATGTGAAGC -3' and 5'-GGTGAAGACTCATGTCTGT-3', respectively. The 204 bp PCR products were digested with PmlI resulting in two fragments of 154 and 50 bp for the CC genotype, one fragment of 204 bp for the TT genotype and three fragments of 204, 154 and 50 bp for the CT genotype.

### Statistical Analysis

The data were analyzed with the SPSS 13.0 software (SPSS Inc, Chicago, IL). The differences in genotype distribution and allele frequency amongst groups and the test for Hardy-Weinberg equilibrium (HWE) were analyzed using the  $\chi^2$  test. Maximum-likelihood haplotype frequencies were calculated using an expectation-maximization algorithm (37) (available online at [http://www.istech.info/istech/board/login\\_form.jsp](http://www.istech.info/istech/board/login_form.jsp)). Findings were considered statistically significant at P values less than 0.05.

## RESULTS

### Subject characteristics

Table 1 shows the demographic and clinical characteristics of the study population. All patients and controls were French Canadian and came from the same geographical area. The two groups were closely matched for age, and the percentage of female was higher in the OA group. BMI is higher in cases than in controls, though the difference was not statistically significant. The mean age of OA onset was  $55.5 \pm 9.1$ . Forty-eight percent of OA patients had disease onset at age under 55.5 years. The mean age of disease duration was  $8.5 \pm 6$ . Seventy-seven percent of OA patients had severe radiographic OA (Kellgren-Lawrence grade 3 or 4). Fifty-one percent of OA patient had severe symptomatic OA (WOMAC score >104). Most of OA patients were taking analgesics, NSAIDs or COXIBs.

### Frequencies of PPAR $\gamma$ gene polymorphisms in OA and control groups.

Genotype and allele frequencies for PPAR $\gamma$  Pro12Ala and C1431T polymorphisms are shown in Table 2. The observed genotype frequencies were in Hardy-Weinberg equilibrium in both the patient and the control populations. Genotype and allele frequencies of the Pro12Ala polymorphism were not significantly different between OA patients and control subjects. There were also no significant differences in the genotype and allele frequencies of C1431T polymorphism between both populations. Since the proportion of subjects who were homozygous was small (1.8% for Pro12Ala, and 2.3% for C1431T), the heterozygous and homozygous variant

genotypes were combined in further analyses.

**PPAR $\gamma$  gene polymorphism in patients with OA stratified by age of OA onset, radiographic and functional severity.**

To determine the effect of PPAR $\gamma$  gene polymorphisms on age of disease onset, we divided our patients into two groups according to the median age of OA onset (55.5 years) and compared PPAR $\gamma$  genotype distributions and allele frequencies. Early onset OA patients were defined as those with disease onset at age under 55.5 years, whereas late onset patients had their disease onset at age above 55.5 years. The genotype distributions and allele frequencies of the Pro12Ala and C1431T polymorphisms were not significantly different between early onset OA, late onset OA patients, and control individuals (Table 3). Stratification by gender also revealed no significant differences between OA patients and control individuals (data not shown).

Next, we examined the effect of PPAR $\gamma$  polymorphisms on the risk of severe radiographic or severe functional OA. Radiographically severe OA patients were defined as those whose Kellgren-Lawrence grade was 3 or 4, whereas radiographically mild OA were defined as having a Kellgren-Lawrence grade of 1 or 2. Functionally severe OA patients were defined as those with a WOMAC index score  $>104$ , while those with a WOMAC score index  $\leq 104$ , were defined as a functionally mild OA group.

There was no significant difference in the genotype distributions and allele frequencies of both polymorphisms between patients with severe or mild radiographic

OA and control individuals. Similarly, there were no differences between patients with mild or severe functional OA and controls.

### **Haplotype analysis**

To investigate whether one particular haplotype is associated with susceptibility to OA, haplotype frequencies of both polymorphisms (SNPs) were estimated by using the maximum-likelihood estimation method (37). The frequencies of the 4 possible haplotypes, for the 2 SNPs, in the OA and control groups are shown in table 4. The most frequent haplotype (Pro-C) accounted for 85 % of the total OA, and 83.6% of the total control population; this is consistent with previous reports on Caucasian populations (29, 38). As shown in Table 4, haplotype frequencies were not statistically different between the OA patients and the control population. In a separate analysis, we found no differences in PPAR $\gamma$  haplotype frequencies between OA patients, stratified according to age at onset, sex, radiographic, and functional OA severity, and controls (data not shown).



## Discussion

The present study is the first attempt to evaluate the role of two PPAR $\gamma$  gene polymorphisms, Pro12Ala and C1431T, in the pathogenesis of OA. These PPAR $\gamma$  polymorphisms have been implicated in several disorders such as type 2 diabetes (27) (29), insulin sensitivity (28), myocardial infarction (30), coronary artery disease (33) atherosclerosis (31), and immunoglobulin A nephropathy (34). In view of the particular relevance of PPAR $\gamma$  in inflammation and cartilage metabolism (18-23, 23, 24), we speculated that PPAR $\gamma$  gene polymorphisms may contribute to the pathogenesis of OA. However, in the present study we found no evidence of an association of these polymorphisms with either the occurrence or the severity of OA.

Genotype and allele frequencies of both polymorphisms were distributed according to the Hardy-Weinberg equilibrium. There was no significant difference in the frequency of either polymorphism or haplotypes between OA patients and controls. The observed lack of association may simply reflect that these polymorphisms have a minor or no role in the susceptibility to OA. Another likely possibility is that the PPAR $\gamma$  polymorphisms might be involved in OA, but this influence was too small to be detected with our study size, and hence a larger sample size could have been required. Alternatively, a possible association could have been weakened by disease heterogeneity, environmental factors or gene-environment interactions as previously demonstrated for this gene (39, 40).

It is possible that the PPAR $\gamma$  gene polymorphisms are associated with disease severity, rather than susceptibility. However, stratification based on severe radiographic damage or functional disability showed no association with either SNPs individually or haplotypes. It should be noted, however, that the patients in our study had longstanding OA (mean duration of  $\approx$  8.5 years), and were all undergoing active management of their disease which would tend to obscure a possible association. Furthermore, measures of disease severity at only a single point are unlikely to reflect the influence that a gene polymorphism may have on OA development. A prospective study with an inception cohort of patients with OA and several measurements of disease severity over time will be needed to better address this issue.

Our study has a number of limitations. First, and as discussed above, our sample size was small, which may limit statistical power to detect any existing association. Second, radiographs were not taken for the control subjects. Felson et al (41) noted that the prevalence of symptomatic knee OA is only 9.5% of radiographically defined knee OA. Therefore, we can not exclude the presence of asymptomatic OA in the control group, possibly weakening the statistical power of our study. Third, we examined only two polymorphisms in this study because of their relatively high frequency. However, several additional polymorphisms have been identified within the PPAR $\gamma$  gene (26), and thus it is quite possible that these polymorphisms contribute to the susceptibility to, or severity of, OA. Finally, the control of PPAR $\gamma$  expression and activity *in vivo* are complex and not well understood, and could be subject to modulation by polymorphisms in other genes. The continued accumulation

of data in SNP databases will help enable these studies.

The PPAR $\gamma$  polymorphism, Pro12Ala, has been shown to be associated with reduced bone mineral density (BMD) in postmenopausal Japanese women (42) and OA is known to be associated with increased BMD (8). Unfortunately, BMD data were not available in our study.

A number of previous studies have examined PPAR $\gamma$  polymorphisms in relation to BMI, however, the results of these studies were inconsistent. Pro12Ala has been found to be associated either with a higher BMI (43) or with lower BMI (44), while other studies have found no association (45). Similarly, C1431T polymorphism has been variably associated with either increased (46), or unchanged (32) BMI. Reasons for such discrepancies could be related to study design (insufficient statistical power), ethnic differences, and genetic heterogeneity. In our study, no association was found between either polymorphism and BMI. This is inconsistent with the findings of Robitaille et al (47), who showed that the Pro12Ala polymorphism is associated with increased BMI in a French Canadian population. One explanation for these divergent findings could be that our study was performed with individuals older than 55 years, enrolled from the general population, whereas Robitaille et al (47) studied a younger obese population.

In conclusion, our data suggest that the investigated PPAR $\gamma$  polymorphisms are not associated with susceptibility to, or severity of, OA in the French Canadian population and can therefore not be regarded as a major cause of OA. These findings will require replication in patients with OA from different ethnic populations.

**Table 1. Characteristics of the study subjects**

Groups	Knee OA (n = 172)	Control (n = 210)
Age (years)	63.9 ± 8.5	63.6 ± 6.6
Sex (Male/female)	112/57	62/148
Body mass index (kg/m <sup>2</sup> )	32.1 ± 5.9	26.7 ± 4.2
Age at onset (years)	55.5 ± 9.1	
Disease duration (years)	8.5 ± 6.00	
Kellgren-Lawrence grade		
1-2	39 (22.6%)	
3-4	133 (77.3%)	
WOMAC score		
0-104	83 (48.8%)	
105-240	86 (51.2%)	

Values are expressed as mean ± standard deviation or as numbers (%).

**Table 2. PPAR $\gamma$  genotype distributions and allelic frequencies in patients with OA and controls**

Polymorphism	<sup>a</sup> Genotype n (%)		<sup>b</sup> Allele n (%)	
	OA (n = 172)	Control (n = 210)	OA (n = 344)	Control (n = 420)
Pro12Ala				
Pro12Pro	138 (80.2%)	159 (75.7%)	Pro 307 (89.2%)	366 (87.1%)
Pro12Ala	31 (18%)	48 (22.9%)		
Ala12Ala	3 (1.8%)	3 (1.4%)	Ala 37 (10.7%)	54 (12.8%)
$\chi^2$	1.37		0.79	
P	0.50		0.37	
C1431T				
CC	135 (78.48%)	163 (77.6%)	C 303 (88.1%)	371 (88.3%)
CT	33 (19.1%)	44 (20.9%)		
TT	4 (2.3%)	3 (1.4%)	T 41 (11.9%)	49 (11.6%)
$\chi^2$	0.57		0.01	
P	0.75		0.91	

A total of 172 patients with osteoarthritis (OA) and 210 control individuals were included in the study. <sup>a</sup>Control individuals versus patients using the  $\chi^2$  test with 3 x 2 contingency table.

<sup>b</sup>Control individuals versus patients using the  $\chi^2$  test with 2 x 2 contingency table.

**Table 3. PPAR $\gamma$  gene polymorphisms in patients with OA stratified by sex, age at onset, radiographic and functional severity.**

Polymorphism	Feature of osteoarthritis (clinical subtypes)					
	<sup>a</sup> Age at onset		<sup>b</sup> Radiographic OA		<sup>c</sup> Functional OA	
	Early (n=83)	Late (n=89)	Mild (n=39)	Severe (n=133)	Mild (n=84)	Severe (n=87)
<b>Pro12Ala</b>						
Genotype distribution						
Pro12Pro	66 (79.5%)	72 (80.9%)	31 (79.5%)	107 (80.5%)	67 (79.8%)	70 (80.5%)
Pro12Ala + Ala12Ala	17 (20.5%)	17 (19.1%)	8 (20.5%)	26 (19.5%)	17 (20.2%)	17 (19.5%)
$\chi^2$	0.48	0.95	0.26	1.05	0.55	0.78
P	0.49	0.32	0.61	0.30	0.45	0.37
Allele frequencies						
Pro12	146 (88.0%)	161 (90.4%)	69 (88.5%)	238 (89.5%)	149 (88.7%)	156 (89.7%)
Ala12	20 (12.0%)	17 (9.6%)	9 (11.5%)	28 (10.5%)	19 (11.3%)	18 (10.3%)
$\chi^2$	0.32	2	0.29	1.59	0.66	1.32
P	0.56	0.15	0.58	0.20	0.41	0.25
<b>C1431T</b>						
Genotype distribution						
CC	64 (77.1%)	71 (79.8%)	32 (82.1%)	103 (77.4%)	66 (78.6%)	68 (78.2%)
CT + TT	19 (22.9%)	18 (20.2%)	7 (17.9%)	30 (22.6%)	18 (21.4%)	19 (21.8%)
$\chi^2$	0.06	0.06	0.24	0.05	0	0.004
P	0.80	0.81	0.62	0.82	1	0.94
Allele frequencies						
C	144 (86.7%)	159 (89.3%)	70 (89.7%)	233 (87.6%)	148 (88.1%)	153 (87.9%)
T	22 (13.2%)	19 (10.7%)	8 (10.3%)	33 (12.4%)	20 (11.9%)	21 (12.1%)
$\chi^2$	0.28	0.12	0.13	0.08	0.007	0.01
P	0.59	0.72	0.72	0.77	0.93	0.89

Data were analyzed using the  $\chi^2$  test with 2 x 2 contingency table.

<sup>a</sup>Early onset OA patients were defined as those with disease onset at age under 55.5 years, whereas late onset patients had disease onset at age above 55.5 years. <sup>b</sup>Radiographically severe OA patients were defined as those whose Kellgren-Lawrence grade was 3 or 4, whereas radiographically mild OA were defined as Kellgren-Lawrence grade 1 or 2. <sup>c</sup>Functionally severe OA patients were defined as those with a WOMAC index score >104, while those with a WOMAC score index  $\leq$ 104, were defined as a functionally mild OA group.

**Table 4. PPAR $\gamma$  haplotype frequencies in OA patients and controls, predicted by an EM algorithm.**

Haplotype	OA (n = 172)	Control (n = 210)	<sup>a</sup> P value
Pro-C	295 (85.4%)	351 (83.6%)	0.55
Pro-T	13 (3.8%)	14 (3.5%)	
Ala-C	9 (2.7%)	19 (4.7%)	
Ala-T	27 (8%)	34 (8.1%)	

A total of 172 patients with osteoarthritis (OA) and 210 control individuals were included in the study. Number of haplotypes are shown with their frequencies in parentheses.

<sup>a</sup>Control individuals versus patients using the  $\chi^2$  test with 4 x 2 contingency table.

## References

1. Lawrence RC, Helmick CG, Arnett FC, Deyo RA, Felson DT, Giannini EH, et al: Estimates of the prevalence of arthritis and selected musculoskeletal disorders in the United States. *Arthritis Rheum* 1998;41:778-799.
2. Martel-Pelletier J: Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12 Suppl A:S31-33.
3. Wieland HA, Michaelis M, Kirschbaum BJ, Rudolphi KA: Osteoarthritis - an untreatable disease? *Nat Rev Drug Discov* 2005;4:331-344.
4. KELLGREN JH, LAWRENCE JS, BIER F: GENETIC FACTORS IN GENERALIZED OSTEO-ARTHROSIS. *Ann Rheum Dis* 1963;22:237-255.
5. KELLGREN JH, LAWRENCE JS: Radiological assessment of osteo-arthritis. *Ann Rheum Dis* 1957;16:494-502.
6. Spector TD, MacGregor AJ: Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis Cartilage* 2004;12 Suppl A:S39-44.
7. Loughlin J, Sinsheimer JS, Mustafa Z, Carr AJ, Clipsham K, Bloomfield VA, et al: Association analysis of the vitamin D receptor gene, the type I collagen gene COL1A1, and the estrogen receptor gene in idiopathic osteoarthritis. *J Rheumatol* 2000;27:779-784.
8. Uitterlinden AG, Burger H, van Duijn CM, Huang Q, Hofman A, Birkenhager JC, et al: Adjacent genes, for COL2A1 and the vitamin D receptor, are associated with separate features of radiographic osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 2000;43:1456-1464.
9. Horton WE Jr, Lethbridge-Cejku M, Hochberg MC, Balakir R, Precht P, Plato CC, et al: An association between an aggrecan polymorphic allele and bilateral hand osteoarthritis in elderly white men: data from the Baltimore Longitudinal Study of Aging (BLSA). *Osteoarthritis Cartilage* 1998;6:245-251.



10. Bergink AP, van Meurs JB, Loughlin J, Arp PP, Fang Y, Hofman A, et al: Estrogen receptor alpha gene haplotype is associated with radiographic osteoarthritis of the knee in elderly men and women. *Arthritis Rheum* 2003;48:1913-1922.
11. Jin SY, Hong SJ, Yang HI, Park SD, Yoo MC, Lee HJ, et al: Estrogen receptor-alpha gene haplotype is associated with primary knee osteoarthritis in Korean population. *Arthritis Res Ther* 2004;6:R415-421.
12. Forster T, Chapman K, Loughlin J: Common variants within the interleukin 4 receptor alpha gene (IL4R) are associated with susceptibility to osteoarthritis. *Hum Genet* 2004;114:391-395.
13. Loughlin J, Dowling B, Mustafa Z, Chapman K: Association of the interleukin-1 gene cluster on chromosome 2q13 with knee osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2002;46:1519-1527.
14. Moos V, Rudwaleit M, Herzog V, Hohlig K, Sieper J, Muller B: Association of genotypes affecting the expression of interleukin-1beta or interleukin-1 receptor antagonist with osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 2000;43:2417-2422.
15. Kliewer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM: A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 1995;83:813-819.
16. Tontonoz P, Hu E, Graves RA, Budavari AI, Spiegelman BM: mPPAR gamma 2: tissue-specific regulator of an adipocyte enhancer. *Genes Dev* 1994;8:1224-1234.
17. Fajas L, Auboeuf D, Raspe E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, et al: The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem* 1997;272:18779-18789.
18. Fahmi H, Di Battista JA, Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, Martel-Pelletier J: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit interleukin-1beta-induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2001;44:595-607.

19. Fahmi H, Pelletier JP, Di Battista JA, Cheung HS, Fernandes J, Martel-Pelletier J: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma activators inhibit MMP-1 production in human synovial fibroblasts by reducing the activity of the activator protein 1. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10: 100-108.
20. Fahmi H, Pelletier JP, Mineau F, Martel-Pelletier J: 15d-PGJ(2) is acting as a 'dual agent' on the regulation of COX-2 expression in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2002;10:845-848.
21. Cheng S, Afif H, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Li X, Farrajota K, et al: Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits interleukin-1beta-induced membrane-associated prostaglandin E2 synthase-1 expression in human synovial fibroblasts by interfering with Egr-1. *J Biol Chem* 2004;279:22057-22065.
22. Li X, Afif H, Cheng S, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Ranger P, et al: Expression and regulation of microsomal prostaglandin E synthase-1 in human osteoarthritic cartilage and chondrocytes. *J Rheumatol* 2005;32:887-895.
23. Fahmi H, Pelletier JP, Martel-Pelletier J: PPARgamma ligands as modulators of inflammatory and catabolic responses on arthritis. An overview. *J Rheumatol* 2002;29:3-14.
24. Bordji K, Grillasca JP, Gouze JN, Magdalou J, Schohn H, Keller JM, et al: Evidence for the presence of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and gamma and retinoid Z receptor in cartilage. PPARgamma activation modulates the effects of interleukin-1beta on rat chondrocytes. *J Biol Chem* 2000;275:12243-12250.
25. Kobayashi T, Notoya K, Naito T, Unno S, Nakamura A, Martel-Pelletier J, et al: Pioglitazone, a peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, reduces the progression of experimental osteoarthritis in guinea pigs. *Arthritis Rheum* 2005;52:479-487.
26. Knouff C, Auwerx J: Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma calls for activation in moderation: lessons from genetics and pharmacology. *Endocr Rev* 2004;25:899-918.

27. Stumvoll M, Haring H: The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes* 2002;51:2341-2347.
28. Ek J, Andersen G, Urhammer SA, Hansen L, Carstensen B, Borch-Johnsen K, et al: Studies of the Pro12Ala polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 (PPAR-gamma2) gene in relation to insulin sensitivity among glucose tolerant caucasians. *Diabetologia* 2001;44:1170-1176.
29. Doney AS, Fischer B, Cecil JE, Boylan K, McGuigan FE, Ralston SH, et al: Association of the Pro12Ala and C1431T variants of PPARG and their haplotypes with susceptibility to Type 2 diabetes. *Diabetologia* 2004;47:555-558.
30. Ridker PM, Cook NR, Cheng S, Erlich HA, Lindpaintner K, Plutzky J, et al: Alanine for proline substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 (PPARG2) gene and the risk of incident myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:859-863.
31. Temelkova-Kurktschiev T, Hanefeld M, Chinetti G, Zawadzki C, Haulon S, Kubaszek A, et al: Ala12Ala genotype of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 protects against atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004;89:4238-4242.
32. Meirhaeghe A, Fajas L, Helbecque N, Cottel D, Lebel P, Dallongeville J, et al: A genetic polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene influences plasma leptin levels in obese humans. *Hum Mol Genet* 1998;7:435-440.
33. Wang XL, Oosterhof J, Duarte N: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma C161-->T polymorphism and coronary artery disease. *Cardiovasc Res* 1999;44:588-594.
34. Song J, Sakatsume M, Narita I, Goto S, Omori K, Takada T, et al: Peroxisome proliferator-activated receptor gamma C161T polymorphisms and survival of Japanese patients with immunoglobulin A nephropathy. *Clin Genet* 2003;64:398-403.

35. Altman R, Asch E, Bloch D, Bole G, Borenstein D, Brandt K, et al: Development of criteria for the classification and reporting of osteoarthritis. Classification of osteoarthritis of the knee. Diagnostic and Therapeutic Criteria Committee of the American Rheumatism Association. *Arthritis Rheum* 1986;29:1039-1049.
36. Bellamy N, Buchanan WW, Goldsmith CH, Campbell J, Stitt LW: Validation study of WOMAC: a health status instrument for measuring clinically important patient relevant outcomes to antirheumatic drug therapy in patients with osteoarthritis of the hip or knee. *J Rheumatol* 1988;15:1833-1840.
37. Yoo J, Seo B, Kim Y: SNPAnalyzer: a web-based integrated workbench for single-nucleotide polymorphism analysis. *Nucleic Acids Res* 2005;33:W483-488.
38. Doney AS, Fischer B, Leese G, Morris AD, Palmer CN: Cardiovascular risk in type 2 diabetes is associated with variation at the PPARG locus: a Go-DARTS study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2004;24:2403-2407.
39. Jaquet D, Tregouet DA, Godefroy T, Nicaud V, Chevenne D, Tiret L, et al: Combined effects of genetic and environmental factors on insulin resistance associated with reduced fetal growth. *Diabetes* 2002;51:3473-3478.
40. Lindi V, Schwab U, Louheranta A, Laakso M, Vessby B, Hermansen K, et al: Impact of the Pro12Ala polymorphism of the PPAR-gamma2 gene on serum triacylglycerol response to n-3 fatty acid supplementation. *Mol Genet Metab* 2003;79:52-60.
41. Felson DT, Naimark A, Anderson J, Kazis L, Castelli W, Meenan RF: The prevalence of knee osteoarthritis in the elderly. The Framingham Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum* 1987;30:914-918.
42. Ogawa S, Urano T, Hosoi T, Miyao M, Hoshino S, Fujita M, et al: Association of bone mineral density with a polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene: PPARgamma expression in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;260:122-126.

43. Beamer BA, Yen CJ, Andersen RE, Muller D, Elahi D, Cheskin LJ, et al: Association of the Pro12Ala variant in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene with obesity in two Caucasian populations. *Diabetes* 1998;47:1806-1808.
44. Yen CJ, Beamer BA, Negri C, Silver K, Brown KA, Yarnall DP, et al: Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997;241:270-274.
45. Ek J, Urhammer SA, Sorensen TI, Andersen T, Auwerx J, Pedersen O: Homozygosity of the Pro12Ala variant of the peroxisome proliferation-activated receptor-gamma2 (PPAR-gamma2): divergent modulating effects on body mass index in obese and lean Caucasian men. *Diabetologia* 1999;42:892-895.
46. Valve R, Sivenius K, Miettinen R, Pihlajamaki J, Rissanen A, Deeb SS, et al: Two polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene are associated with severe overweight among obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999;84:3708-3712.
47. Robitaille J, Despres JP, Perusse L, Vohl MC: The PPAR-gamma P12A polymorphism modulates the relationship between dietary fat intake and components of the metabolic syndrome: results from the Quebec Family Study. *Clin Genet* 2003;63:109-116.

Supported by grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, IMH-63168), the Fonds de Recherche en Santé du Québec (FRSQ, JC2836), and the Fonds de la Recherche du Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal. S.C is supported by a fellowship from the CIHR Training on Mobility and Posture Deficiencies (MENTOR). H.F is a Research Scholar of FRSQ.

**Acknowledgements :** We thank M. Ouellet and R. Grégoire for collecting blood samples We are also grateful to K. Farrajota and A. Watson for their technical assistance.

## D. DISCUSSION

La  $PGE_2$  est un important médiateur de l'inflammation et son inhibition est le but visé par plusieurs traitements antiarthritiques. La biosynthèse de la  $PGE_2$  implique plusieurs enzymes, notamment les COXs et les PGES. Ces deux enzymes sont les plus décrites dans la littérature à cause de leur implication dans de nombreuses pathophysiologies. D'une part, il y a les COXs qui sont des enzymes impliquées dans la production de la  $PGE_2$  et leur découverte a permis au développement de plusieurs traitements antiarthritiques, notamment les AINS. Par contre, ces traitements qui ciblent les COXs (ou la COX-2 pour ceux de type coxibs) possèdent malheureusement des effets secondaires indésirables dus à une non-spécificité de leurs activités. D'autre part, il y a la mPGES-1, celle-ci est l'enzyme terminale responsable dans la biosynthèse de la  $PGE_2$ . Des expériences ont démontré qu'elle est inductible par des stimuli pro-inflammatoires et que son expression est inhibée par des glucocorticoïdes anti-inflammatoires (Stichtenoth *et al*, 2001). Les fonctions de la mPGES-1 sont couplées à la COX-2. De plus, une surexpression de la mPGES-1 et de la COX-2 par des stimuli pro-inflammatoires est associée à une hausse de production de la  $PGE_2$  (Jakobsson *et al*, 1999; Murakami *et al*, 2000; Mancini *et al*, 2001; Thorén *et al*, 2000; Soler *et al*, 2001; Stichtenoth *et al*, 2001).

Par ailleurs, plusieurs travaux ont démontré les propriétés thérapeutiques de PPAR $\gamma$  et de ses ligands dans l'athérosclérose, le cancer, l'obésité ainsi que dans

l'inflammation (Beak *et al*, 2004). Des études réalisées dans notre laboratoire ont illustré les effets inhibiteurs de PPAR $\gamma$  sur des réponses induites à l'IL-1 $\beta$  chez les synoviocytes et chez les chondrocytes humains, notamment la production de la NO, de la MMP-13 et de la COX-2 chez les chondrocytes, et celle de la MMP-1 chez les synoviocytes (Fahmi *et al*, 2001; Fahmi *et al*, 2002; Fahmi *et al*, 2002). Par contre, les effets de l'activation de PPAR $\gamma$  sur l'expression de la mPGES-1 dans les tissus articulaires OA restent encore indéterminés.

Dans ce projet de mémoire, nous avons étudié les mécanismes par lesquels l'activation de PPAR $\gamma$  par la 15d-PGJ<sub>2</sub>, un ligand naturel, et la TRO, un ligand synthétique de PPAR $\gamma$ , peut réguler l'expression de la mPGES-1 dans les synoviocytes humains. L'usage des synoviocytes dans cette étude est rationalisé par leur éminente implication dans l'OA.

Dans cette étude, nous avons tout d'abord confirmé que la 15d-PGJ<sub>2</sub> et la TRO inhibent la production induite de la PGE<sub>2</sub> par l'IL-1 $\beta$  d'une manière dose-dépendante, contrairement au ligand de PPAR $\alpha$ , le Wy14643, qui n'affecte pas la production de la PGE<sub>2</sub> de manière significative. Les effets inhibiteurs des ligands de PPAR $\gamma$  ont été constatés sur l'expression de la protéine et de l'ARNm et au niveau de l'activité du promoteur de la mPGES-1, proposant ainsi que la 15d-PGJ<sub>2</sub> et la TRO inhibent la mPGES-1 au niveau transcriptionnel. De plus, dans le but d'élucider les mécanismes derrière cette régulation, nous avons prouvé que cette inhibition de la



mPGES-1 induite par l'IL-1 $\beta$  est médié par PPAR $\gamma$ . Plusieurs travaux effectués antérieurement ont démontré que les effets inhibiteurs de la 15d-PGJ<sub>2</sub> et de la TRO pouvaient être médiés indépendamment de PPAR $\gamma$ , et que cet effet variait considérablement selon le type cellulaire (Fahmi *et al*, 2002). Il est présumé que la 15d-PGJ<sub>2</sub> emprunterait un mécanisme autre que celui de PPAR $\gamma$  étant donné que la 15d-PGJ<sub>2</sub> possède une plus faible affinité pour PPAR $\gamma$  comparativement au TRO. Il est suggéré que la 15d-PGJ<sub>2</sub> interagirait avec la voie de signalisation de NF- $\kappa$ B à plusieurs niveaux (Strauss *et al*, 2000; Rossi *et al*, 2000). Elle induirait une modification covalente dans le domaine d'activation d'I $\kappa$ B kinase beta ou encore se lierait au domaine de fixation de l'ADN de la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B. Une surexpression de PPAR $\gamma$  dans des expériences de transfections transitoires illustre le mécanisme PPAR $\gamma$ -dépendant adopté par la 15d-PGJ<sub>2</sub> et la TRO. L'effet renversé presque total de la 15d-PGJ<sub>2</sub> et de la TRO sur l'expression induite de la mPGES-1 par un prétraitement avec l'antagoniste de PPAR $\gamma$ , le GW9669, confirme que les effets sont effectivement médiés via PPAR $\gamma$ .

Il a été établi que le facteur de transcription Egr-1 est impliqué de manière substantielle dans la régulation de l'expression de la mPGES-1 en se liant aux boîtes GC du promoteur de cette dernière (Naraba *et al*, 2002; Subbaramaiah *et al*, 2004). Afin de déterminer si Egr-1 est impliqué dans l'inhibition de la mPGES-1 induite par l'activation de PPAR $\gamma$ , des expériences avec l'utilisation d'un gène rapporteur d'Egr-1 ont été effectuées. Les résultats confirment que ce facteur de transcription active le promoteur de la mPGES-1. De plus, l'activité du promoteur de la mPGES-1

ainsi que celle d'une construction contenant trois fois le site de liaison d'Egr-1 est réduite lors d'une cotransfection de PPAR $\gamma$ . Cette réduction par PPAR $\gamma$  se manifeste de manière encore plus prononcée lorsque son ligand est présent. Ceci indique que PPAR $\gamma$  inhibe l'expression de la mPGES-1 en inhibant l'activité transcriptionnelle d'Egr-1. Par des expériences de retardement sur gel, nos résultats illustrent que la 15d-PGJ<sub>2</sub> de même que la TRO diminuent l'activité de liaison d'Egr-1 à son site consensus et ceci, d'une manière indépendante du promoteur. Cette diminution démontre que la 15d-PGJ<sub>2</sub> et la TRO inhibent l'induction de l'expression de la mPGES-1 au niveau transcriptionnel en inhibant l'activité transcriptionnelle d'Egr-1 au promoteur de la mPGES-1.

Par conséquent, les mécanismes par lesquels les ligands inhibent l'activité d'Egr-1 ne sont pas clairs. Une des hypothèses pouvant expliquer cette observation serait que la 15d-PGJ<sub>2</sub> et la TRO inhibent l'activation d'Egr-1 en inhibant son expression, puisque des études réalisées dans un système mononucléé phagocytaire ont démontré que la TRO interférait avec l'activation de d'Egr-1 *in vivo* et *in vitro* en inhibant son expression (Okada *et al*, 2002). En revanche, d'après nos résultats, ce mécanisme n'est pas possible puisque la 15d-PGJ<sub>2</sub> et la TRO n'ont eu aucun effet sur l'induction de l'expression protéique d'Egr-1 dans les synoviocytes. Une deuxième hypothèse serait une compétition entre les ligands de PPAR $\gamma$  et Egr-1 pour le site de liaison au promoteur de la mPGES-1. Le groupe de recherche de Corvol a révélé que PPAR $\gamma$  peut se trouver en concurrence avec le facteur de transcription AP-1 pour le site PPRE du promoteur de la MMP-1 dans les chondrocytes (François *et al*, 2004). Néanmoins, cette possibilité de compétition entre PPAR $\gamma$  et Egr-1 n'est pas possible

dans notre cas puisque le promoteur de la mPGES-1 ne possède pas d'élément PPRE dans la construction utilisée. Similairement, PPAR $\gamma$  ne s'est pas lié au site de liaison d'Egr-1 sur le promoteur de la mPGES-1 dans nos expériences de retardement sur gel. Par ailleurs, on sait que PPAR $\gamma$  interagit avec certains facteurs de transcription tels que NF- $\kappa$ B, AP-1, STAT et NF-AT par interaction protéine-protéine (Delerive *et al*, 1999; Fahmi *et al*, 2002). Cette répression de la 15d-PGJ<sub>2</sub> et de la TRO sur l'activité d'Egr-1 pourrait simplement être le résultat d'une interaction entre PPAR $\gamma$  et Egr-1 inhibant ainsi son activité transcriptionnelle ou son activité de liaison à l'ADN. Plusieurs études proposent un autre mécanisme par lequel PPAR $\gamma$  médie ces effets inhibiteurs. Ce mécanisme nommé « squelching » est une titration des coactivateurs essentiels à l'activation de la transcription des gènes tels que CBP/p300 et SRC-1 (Li *et al*, 2000). En effet, il a été démontré que PPAR $\gamma$  peut interagir avec CBP/p300 suite à l'activation par son ligand et former des complexes d'initiation de la transcription (Qi *et al*, 2003; Kodera *et al*, 2000). De même, Egr-1 peut aussi interagir avec CBP/p300 (Silverman *et al*, 1998; Barthel *et al*, 2003). La disponibilité de CBP/p300 pour la transactivation des gènes est réduite et présente en quantité limitée. Ce squelching de CBP/p300 semble être un mécanisme probable puisque nos expériences démontrent qu'une surexpression du dominant négatif de PPAR $\gamma$  en absence de recrutement de coactivateurs surmonte les effets inhibiteurs de la 15d-PGJ<sub>2</sub> et de la TRO de l'activité du promoteur de la mPGES-1.

Dans d'autres contextes, Egr-1 est impliqué dans l'induction de plusieurs gènes pro-inflammatoires tels que l'IL-1 $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et l'IL-2 (Yan *et al*, 2000; Yao

*et al*, 1997; Decker *et al*, 2003). Parallèlement, il est bien établi que PPAR $\gamma$  possède des propriétés anti-inflammatoires en régulant négativement la production de médiateurs pro-inflammatoires tels que les cytokines et les MMPs (Yamasaki *et al*, 2002; François *et al*, 2004; Bordji *et al*, 2000). D'ailleurs, PPAR $\gamma$  inhibe l'expression de gènes pro-inflammatoires et il est donc possible que PPAR $\gamma$  exercerait ces effets anti-inflammatoires en interférant avec Egr-1.

D'une autre manière, une des explications à l'inhibition de l'expression de la mPGES-1 induite serait que les ligands de PPAR $\gamma$  interagissent avec d'autres facteurs de transcription associés au promoteur de la mPGES-1. Au reste, le promoteur de la mPGES-1 possède d'autres sites de liaison pour d'autres facteurs de transcription qu'Egr-1, notamment AP-1 et Sp1 (Naraba *et al*, 2002; Ekstrom *et al*, 2003). Leurs rôles dans le promoteur de la mPGES-1 sont encore inconnus. Il est intéressant d'observer que ces facteurs de transcription peuvent aussi interagir avec PPAR $\gamma$  (Subbaramaiah *et al*, 2001; Hong *et al*, 2004), mais que leurs régulations dans le promoteur de la mPGES-1 dans les synoviocytes ne sont pas encore connues. Il n'est pas exclu que la 15d-PGJ<sub>2</sub> et la TRO peuvent inhiber l'expression de la mPGES-1 induite par l'IL-1 $\beta$  dans les synoviocytes en interférant avec ces facteurs de transcription.

Comme PPAR $\gamma$  inhibe l'expression de gènes pro-inflammatoires et possèdent des propriétés anti-inflammatoires *in vitro*, il est pertinent d'observer ses effets *in vivo*. Par exemple, dans des modèles expérimentaux d'animaux d'OA et de RA, l'utilisation des ligands de PPAR $\gamma$  s'est avérée bénéfique puisqu'elle atténuait les

effets cliniques de l'inflammation et réduisait la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-1 $\beta$ , et de la MMP-13 (Kawahito *et al*, 2000; Cuzzocrea *et al*, 2003; Kobayashi *et al*, 2005). L'inhibition de la mPGES-1 pourrait s'avérer faire partie de plusieurs mécanismes d'action par lesquels les ligands de PPAR $\gamma$  exercent leurs propriétés anti-inflammatoires. De plus, les agonistes de PPAR $\gamma$ , les TZDs, sont couramment prescrits (seul le TRO a été retiré du marché dû à des effets nocifs sur le système hépatique). L'efficacité de ces agonistes dans le traitement des maladies arthritiques reste à être déterminée.

Toujours dans le but de trouver de nouvelles interventions stratégiques, des études dans notre laboratoire, combinées à d'autres études, ont démontré les propriétés anti-inflammatoires de PPAR $\gamma$  dans les tissus articulaires OA. En outre, PPAR $\gamma$  est présent dans les cellules des tissus articulaires : les synoviocytes (Fahmi *et al*, 2002; Yamasaki *et al*, 2002), les chondrocytes (Boyault *et al*, 2001; Fahmi *et al*, 2002), et dans les ostéoblastes (Ogawa *et al*, 1999). Dans la deuxième partie de ce projet de recherche, nous avons étudié la contribution de deux polymorphismes communs du gène de PPAR $\gamma$ , la Pro<sup>12</sup>Ala et la C1431T, dans la pathogénèse de l'OA chez les Canadiens-Français. Effectivement, ces deux polymorphismes ont été décrits comme étant associés à différentes physiopathologies, notamment le diabète de type 2, la sensibilité à l'insuline (Deeb *et al*, 1998; Mori *et al*, 2001; Stumvoll *et al*, 2002), l'infarctus de myocarde (Ridker *et al*, 2003), la néphropathie de l'immunoglobuline A (Song *et al*, 2003) et l'athérosclérose (Temelkova-Kurktschiev *et al*, 2004).

Cependant, dans la présente étude, nous n'avons pas trouvé d'indices qu'il existe une association entre les SNPs de la Pro<sup>12</sup>Ala ou de la C1431T avec l'occurrence et/ou à la sévérité de l'OA.

Nous avons d'abord catégorisé les patients d'après leurs profils. Leurs caractéristiques n'étant significativement pas différentes, nous avons pu comparer le groupe de sujets sains et de sujets OA. Les fréquences alléliques obtenues par notre analyse sont de 12,8 % pour la Ala<sup>12</sup> et 11,6 % pour la T1431, et 10,7 % pour la Ala<sup>12</sup> et 11,9 % pour la T1431 pour les sujets normaux et OA, respectivement. Ces résultats se situent relativement dans la norme des fréquences retrouvées chez les Caucasiens, qui sont de ~12 % et de 14-16,3 % pour la Ala<sup>12</sup> et la T1431, respectivement (Vigoureux *et al*, 2000; Mori *et al*, 2001). Néanmoins, les fréquences polymorphiques et alléliques ne diffèrent pas de manière significative entre le groupe de sujets contrôles et celui de sujets OA.

Les analyses de notre étude n'étant pas démonstratives positivement, plusieurs justifications appuient nos résultats. Le nombre de sujets dans cette étude étant relativement faible, il est très possible que cette étude ne soit pas assez représentative de la population canadienne-française et que le niveau de détection pour une association entre les SNPs étudiés et l'incidence ou la sévérité de l'OA ne soit pas atteint. Ceci suggérerait que ces SNPs ne jouent aucun rôle ou encore un rôle mineur dans la susceptibilité ou la sévérité de l'OA. Par contre, plusieurs autres mutations ont été décrites pour le gène de PPAR $\gamma$  telles que la -681C>G, la -689C>T, la Pro115Gln, la Val318Met, la Pro388Leu, la Arg425Cys et la Pro495Leu (Knouff *et al*, 2004, Meirhaeghe *et al*, 2005). Il est donc possible que ces autres

polymorphismes soient impliqués dans la susceptibilité ou la sévérité de l'OA.

Plusieurs études ont démontré une association entre le polymorphisme de la Pro<sup>12</sup>Ala de PPAR $\gamma$  et l'obésité, la résistance à l'insuline et le diabète de type 2. Entre autres, une étude récente suggère une interaction entre les habitudes alimentaires et la Pro<sup>12</sup>Ala du gène de PPAR $\gamma$  (Luan *et al*, 2001; Memisoglu *et al*, 2003). Les facteurs environnementaux et les interactions gène-environnement et gène-régime alimentaire du sujet peuvent ainsi atténuer l'association entre les SNPs et la susceptibilité à l'OA.

Par ailleurs, il est probable que ces polymorphismes soient associés à la sévérité de l'OA plutôt qu'à sa susceptibilité. Cependant, notre étude ne démontre aucune corrélation polymorphique ou allélique, même suite à une analyse stratifiée d'après la sévérité radiographique et fonctionnelle de l'OA. Il a été démontré qu'il n'existe pas souvent une corrélation entre la sévérité radiographique de l'OA et la douleur ressentie (Hannan *et al*, 2000). Les sujets OA, dans cette étude, sont des patients OA chroniques. La durée moyenne de la maladie étant de 8,4 ans approximativement, ils gèrent de manière active leurs symptômes. Conséquemment, l'OA étant une maladie chronique, il est vraisemblable que la classification de ces patients ne soit pas exacte puisque la sévérité de l'OA chez le patient n'a été mesurée qu'à une seule fréquence.

Une limitation de la présente étude sont les sujets « contrôles » puisque n'ayant pas leur profil radiographique, il se pourrait que ces sujets « contrôles » soient atteints d'OA de manière asymptomatique. Ceci pourrait donc avoir un effet biaisé sur notre analyse et la rendre ainsi moins précise.

L'association de la Pro<sup>12</sup>Ala et de la C1431T avec l'IMC a été le sujet de plusieurs travaux. Leurs effets sur l'IMC restent encore discutables. En effet, l'hypothèse que l'Ala<sup>12</sup> réduise l'IMC chez les non-obèses (Yen *et al*, 1997; Deeb *et al*, 1998) est contestée par d'autres études, car aucun changement n'a été observé (Meirhaeghe *et al*, 1998; Ek *et al*, 1999; Clement *et al*, 2000) ou encore, parce que l'IMC n'était que légèrement plus élevé (Beamer *et al*, 1998; Valve *et al*, 1999). L'association de la C1431 et de l'IMC est argumentée de façon similaire puisque certains trouvent une association avec un IMC plus élevé (Valve *et al*, 1999) ou ne trouvent aucune association avec l'IMC (Meirhaeghe *et al*, 1998). Dans cette étude, nous n'avons trouvé aucune correspondance entre les SNPs et l'IMC. Comme la population de notre étude était âgée de 55 ans et plus, il est très possible que nous ne puissions pas nous comparer aux autres études, car l'âge des patients variait grandement.

## I. Perspectives

Les mécanismes par lesquels les ligands de PPAR $\gamma$  interfèrent avec l'activité d'Egr-1 dans le promoteur de la mPGES-1 dans les synoviocytes, restent ambigus. Une situation possible serait que PPAR $\gamma$  interagisse physiquement avec Egr-1 et l'empêcherait de se lier à son promoteur cible. Ce genre de mécanisme a déjà été décrit avec d'autres facteurs de transcription tels que NF-AT et Sp1. L'activation de PPAR $\gamma$ , suite à la liaison de son ligand, engendrerait alors une interaction de PPAR $\gamma$  avec Egr-1 et diminuerait l'activité de celle-ci ainsi que sa transactivation. Des



expériences de coimmunoprécipitation de PPAR $\gamma$  et d'Egr-1 permettront de déterminer si l'activation de PPAR $\gamma$  cause une augmentation d'interactions entre Egr-1 et PPAR $\gamma$ . Des expériences complémentaires d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) pourront confirmer les effets de la 15d-PGJ<sub>2</sub> et de la TRO sur cette interaction au promoteur de la mPGES-1.

La répression de PPAR $\gamma$  dans la transcription des gènes a aussi été démontrée antérieurement lorsqu'une compétition avait lieu avec des coactivateurs importants requis pour l'activation transcriptionnelle (Li *et al*, 2000). En fait, PPAR $\gamma$  et Egr-1 sollicitent ces coactivateurs tels que CBP/p300 et SRC-1, qui sont présents en quantité limitante. Cette hypothèse peut être vérifiée par des expériences de coimmunoprécipitation de PPAR $\gamma$  et des ces coactivateurs. Comme il a été décrit que CBP et SRC-1 se lie directement au domaine de liaison ligand-dépendant de PPAR $\gamma$  (Li *et al*, 2000), des expériences de transfection impliquant un mutant de PPAR $\gamma$  confirmeront ce mécanisme.

Des facteurs de transcription autres qu'Egr-1 peuvent se lier au promoteur de la mPGES-1, notamment AP-1 et Sp1. Des études de coimmunoprécipitation et/ou de ChIP impliquant ces facteurs de transcription élucideront si d'autres facteurs de transcription jouent un rôle primordial dans la régulation de l'expression induite de la mPGES-1 dans les synoviocytes.

D'une part, il serait intéressant, à long terme, d'étudier le rôle des

modifications épigénétiques dans l'expression différentielle de la mPGES-1. En effet, nous avons remarqué que l'expression basale de la mPGES-1 dans les synoviocytes variait considérablement d'un individu à l'autre contrairement à d'autres gènes. Ceci suggère l'implication des modifications de la chromatine dans la régulation de l'expression de la mPGES-1. L'état du promoteur de la mPGES-1 chez les différents individus sera comparé et corrélé avec l'expression de la mPGES-1. Les modifications post-traductionnelles sont des événements éminents dans la régulation de l'expression des gènes. L'acétylation des histones, la méthylation des histones ainsi que la méthylation de l'ADN sont des modifications post-traductionnelles qui sont des sujets de recherche importants, encore inexplorés, et il serait essentiel de vérifier si cette avenue peut régler des données susceptibles de faire avancer les connaissances entourant certains mécanismes pathologiques de cette maladie.

D'autre part, nos travaux sur les polymorphismes du gène de PPAR $\gamma$  possèdent plusieurs limitations. Premièrement, nous aurions besoin de plus de sujets « contrôles » et arthrosiques pour illustrer l'amplitude de cette étude dans une population canadienne-française. Deuxièmement, il serait plus précis d'avoir des sujets contrôles dont le profil radiographique a été obtenu, assurant ainsi que ses sujets ne sont pas OA asymptomatique. Dans un dernier temps, notre présente étude ne s'est concentrée que sur deux SNPs. Il serait possible que d'autres polymorphismes dans le gène de PPAR $\gamma$  soient impliqués de manière directe ou indirecte dans la susceptibilité ou dans la sévérité de l'OA et il serait donc intéressant d'étudier l'implication des autres polymorphismes du gène de PPAR $\gamma$ .

## E. CONCLUSION

Cette étude vise à analyser la régulation de l'expression de la mPGES-1, une enzyme impliquée dans l'OA et associée à des réactions inflammatoires dans les synoviocytes OA humains. Étant donné que PPAR $\gamma$  possède des propriétés anti-inflammatoires, nous avons étudié les effets de l'activation de PPAR $\gamma$  sur l'expression de la mPGES-1 induite par l'IL-1 $\beta$ . De plus, nous avons tenté de démontrer l'implication de PPAR $\gamma$  dans l'OA par des études sur deux polymorphismes du gène de PPAR $\gamma$ .

Dans un premier temps, nous avons confirmé que deux ligands, couramment utilisés, la 15d-PGJ<sub>2</sub> et la TRO, ont un effet inhibiteur sur la production stimulée de la PGE<sub>2</sub>. Nous avons confirmé que ces ligands inhibent l'expression de la mPGES-1 et que cette inhibition se fait au niveau transcriptionnel. La 15d-PGJ<sub>2</sub> peut exercer ses effets inhibiteurs par des mécanismes dépendants ou indépendants de PPAR $\gamma$ . Nos travaux démontrent que la 15d-PGJ<sub>2</sub> et la TRO inhibent l'expression de la mPGES-1 par des mécanismes dépendants de PPAR $\gamma$ . Par ailleurs, nous avons confirmé que le facteur de transcription Egr-1 joue un rôle important dans la régulation de l'expression de la mPGES-1 et qu'en fait, les ligands de PPAR $\gamma$  inhibent l'expression de la mPGES-1 en interférant avec l'activité de liaison d'Egr-1 au promoteur de celui-ci.

Dans un deuxième temps, par des analyses polymorphiques et alléliques, nous avons montré qu'il n'existe pas d'association entre les SNPs de la Pro<sup>12</sup>Ala, une mutation dans le domaine de liaison de PPAR $\gamma$ , et la C1431T, une mutation silencieuse du gène de PPAR $\gamma$  et la susceptibilité ou la sévérité de l'OA dans une population canadienne-française.

En conclusion, les résultats obtenus dans ce projet démontrent que les inhibiteurs de l'expression et/ou de l'activité de la mPGES-1, celle-ci étant une cible plus spécifique pour la production de la PGE<sub>2</sub> que la COX-2, pourraient constituer une nouvelle classe de traitements thérapeutiques dans l'arthrite. En outre, les ligands de PPAR $\gamma$  pourraient être d'excellents candidats en tant qu'inhibiteurs de la mPGES-1. Cette étude nous a aussi permis d'éclaircir l'implication de PPAR $\gamma$  dans la susceptibilité de la pathophysiologie de l'OA. En revanche, l'implication du gène de la mPGES-1 et, conséquemment, la contribution de ses mutations dans la physiopathologie de l'OA, pourraient nous permettre de mieux comprendre l'épidémiologie de cette maladie multifactorielle si complexe.

## F. RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### A

---

**Abe M, Tanaka Y, Saito K, Shirakawa F, Koyama Y, Goto S, Eto S.** Regulation of interleukin (IL)-1 $\beta$  gene transcription induced by IL-1 $\beta$  in rheumatoid synovial fibroblast-like cells, E11, transformed with simian virus 40 large T antigen. *J Rheumatol* 1997; 24:420-1329.

**Abramson SB.** Inflammation in osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl* 2004; 70: 70-74.

**Al-Arfaj AS.** Radiographic osteoarthritis and obesity. *Saudi Med J* 2002; 23: 938-942.

Antithrombotic Trialists' Collaboration. Collaborative meta-analysis of randomised trials of antiplatelet therapy for prevention of death, myocardial infarction, and stroke in high risk patients. *BMJ* 2002; 324: 71-86.

**Asano T, Wakisaka M, Yoshinari M, Iino K, Sonoki K, Iwase M, Fujishima M.** Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ 1 (PPAR $\gamma$ 1) expresses in rat mesangial cells and PPAR $\gamma$  agonists modulate its differentiation. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1497: 148-54.

### B

---

**Baek SJ, Kim JS, Nixon JB, DiAugustine RP, Eling TE.** Expression of NAG-1, a transforming growth factor-beta superfamily member, by troglitazone requires the early growth response gene EGR-1. *J Biol Chem.* 2004; 279: 6883-92.

**Barthel R, Tsytsykova AV, Barczak AK, Tsai EY, Dascher CC, Brenner MB, Goldfeld AE.** Regulation of tumor necrosis factor alpha gene expression by mycobacteria involves the assembly of a unique enhanceosome dependent on the coactivator proteins CBP/p300. *Mol Cell Biol* 2003; 23: 526-533.

**Beamer BA, Yen CJ, Andersen RE, Muller D, Elahi D, Cheskin LJ, Andres R, Roth J, Shuldiner AR.** Association of the Pro12Ala variant in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 gene with obesity in two Caucasian populations. *Diabetes* 1998; 47: 1806-1808.

**Bell-Parikh LC, Ide T, Lawson JA, McNamara P, Reilly M, FitzGerald GA.** Biosynthesis of 15-deoxy-delta12,14-PGJ2 and the ligation of PPARgamma. *J Clin Invest* 2003; 112: 945-955.

**Belvisi MG, Saunders MA, Haddad el-B, Hirst SJ, Yacoub MH, Barnes PJ, Mitchell MA.** Induction of cyclo-oxygenase-2 by cytokines in human cultured airway smooth muscle cells: novel inflammatory role of this cell type. *Br J Pharmacol* 1997; 120: 910-916.

**Berembaum F.** Osteoarthritis: Epidemiology, pathology, and pathogenesis. Dans: Klipper JH, Crofford LJ, Stone JH, Weyand CM (eds) *Primer on the Rheumatic Diseases*. Georgia: The Arthritis Foundation, 2001: pp 285-289.

**Berenbaum F.** Signaling transduction. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16: 616-622.

**Berembaum F.** COX-3: fact or fancy? *Joint Bone Spine*. 2004; 71:451-3.

**Berger J, Moller DE.** The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med* 2005; 53: 409-35.

**Beukmann CT, Fujimori K, Urade Y, Hayaishi O.** Identification of mu-class glutathione transferases M2-2 and M3-3 as cytosolic prostaglandin E synthases in the human brain. *Neurochem Res* 2000; 25: 733-8.

**Bhattacharya M, Peri KG, Ribieiro-da-Silva A, Almazan G, Shichi H, Hou X, Varma DR, Chemtob S.** Localization of functional prostaglandin E2 receptors EP3 and EP4 in the nuclear envelope. *J Biol Chem* 1999; 274: 15719-24.

**Bordji K, Grillasca JP, Gouze JN, Magdalou J, Schohn H, Keller JM, Bianchi A, Dauça M, Netter P, Terlain B.** Evidence for the presence of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) alpha and gamma and retinoid Z receptor in cartilage. PPARgamma activation modulates the effects of interleukin-1beta on rat chondrocytes. *J Biol Chem* 2000; 275:12243-50.

**Boskey AL.** The Musculoskeletal System: Bone. Dans: Klipper JH, Crofford LJ, Stone JH, Weyand CM (eds) *Primer on the Rheumatic Diseases*. Georgia: The Arthritis Foundation, 2001: pp 17-21.

**Boyault S, Simonin MA, Bianchi A, Compe E, Liagre B, Mainard D, Becuwe P, Dauca M, Netter P, Terlain B, Bordji K.** 15-deoxy- $\Delta^{12,14}$ -PGJ<sub>2</sub>, but not troglitazone, modulates IL-1 $\beta$  effects in human chondrocytes by inhibiting NF- $\kappa$ B and AP-1 activation pathways. *FEBS Lett* 2001; 501: 24-30.

**Bradley LA, Alberts KR.** Psychological and behavioral approaches to pain management for patients with rheumatic disease. *Rheum Dis Clin North Am* 1999; 25: 215-232.

**Brandt KD, Smith GN, Simon LS.** Intraarticular hyaluronan as treatment for knee osteoarthritis: what is the evidence? *Arthritis Rheum* 2000; 43: 1192-1203.

**Brandt KD.** Osteophytes in osteoarthritis. Clinical aspects. *Osteoarthri. Cartil* 2000; 7: 334-335.

**Bryant CE, Appleton I, Mitchell JA.** Vascular endothelial growth factor upregulates constitutive cyclooxygenase-1 in primary bovine and human endothelial cells. *Life Sci* 1998; 62: 2195-201.

**Buckwalter JA, Ballard WT, Brooks P.** Principles of arthritis surgery. Dans: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH (eds) Rheumatology. London: Mosby. 2003. pp.531-542.

## C

---

**Caramori ML, Canani LH, Costa LA, Gross JL.** The human peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 (PPARgamma2) Pro12Ala polymorphism is associated with decreased risk of diabetic nephropathy in patients with type 2 diabetes, *Diabetes* 2003;53: 3010-3013.

**Catley MC, Chivers JE, Cambridge LM, Holden N, Slater DM, Staples KJ, Bergmann MW, Loser P, Barnes PJ, and Newton P.** IL-1 $\beta$ -dependent activation of NF- $\kappa$ B mediates PGE<sub>2</sub> release via the expression of cyclooxygenase-2 and microsomal prostaglandin E synthase. *FEBS Lett* 2003; 547: 75-79.

**Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, Simmons DL.** COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 13926-31.

**Chandrasekharan NV, Simmons DL.** The cyclooxygenases. *Genome Biol.* 2004; 5: 241.

**Cheng HF, Wang JL, Zhang MZ, Wang SW, McKanna JA, Harris RC.** Genetic deletion of COX-2 prevents increased renin expression in response to ACE inhibition. *Am J Physiol* 2001; 280: F449-456.

**Cheng S, Afif H, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Li X, Farrajota K, Lavigne M, Fahmi H.** Activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma inhibits interleukin-1beta-induced membrane-associated prostaglandin E2 synthase-1 expression in human synovial fibroblasts by interfering with Egr-1. *J Biol Chem.* 2004; 279: 22057-65.

**Chinetti G, Griglio S, Antonucci M, Torra IP, Delerive P, Majd Z, Fruchart JC, Chapman J, Najib J, Staels B.** Activation of proliferator-activated receptors  $\alpha$  and  $\gamma$  induces apoptosis of human monocyte-derived macrophages. *J Biol Chem* 1998; 273: 25573-80.

**Cicuttini FM, Baker J, Hart DJ, Spector TD.** Association of pain with radiological changes in different compartments and views of the knee joint. *Osteoarthritis Cartilage* 1996; 4: 143-147.

**Claveau D, Sirinyan M, Guay J, Gordon R, Chan C, Bureau Y, Riendeau D, Mancini JA.** Microsomal prostaglandin E synthase-1 is a major terminal synthase that is selectively up-regulated during cyclooxygenase-2-dependent prostaglandin E2 production in the rat adjuvant-induced arthritis model. *J Immunol* 2003; 170: 4738-4744.

**Clement K, Herberg S, Passinge B, Galan P, Varroud-Viad M, Shuldiner AR, Beamer BA, Charpentier F, Guy-Grand B, Froguel P, Vaisse C.** The Pro115Gln and Pro12Ala PPAR gamma gene mutations in obesity and type 2 diabetes. *Int J Obes Relat Metab Disord* 2000; 24: 391-393.

**Cruzzocrea S, Mazzon E, Dugo L, Patel NS, Serraino I, Di Paola R, Genovese T, Britti D, De Maio M, Caputi AP, Thimermann C.** Reduction in the evolution of murine type II collagen-induced arthritis by treatment with rosiglitazone, a ligand of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 3544-3556.

## D

---

**Daynes RA, Jones DC.** Emerging roles of PPARs in inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol* 2002; 2: 748-759.

**Decker EL, Nehmann N, Kampen E, Eibel H, Zipfel PF, Skerka C.** Early growth response proteins (EGR) and nuclear factors of activated T cells (NFAT) form heterodimers and regulate proinflammatory cytokine gene expression. *Nucleic Acid Res* 2003; 31: 911-921.

**Deeb S, Fajas L, Nemoto M, Laakso M, Fujimoto W, Auwerx J.** A Pro12Ala substitution in PPARgamma2 associated with decreased receptor activity, lower body mass index and improved insulin sensitivity. *Nat Genet* 1998; 20: 284-287.

**Delarive P, Martin-Nizard F, Chinetti G, Trottein F, Fruchart JC, Najib J, Durieb P, Staels B.** Peroxisome proliferator-activated receptor activators inhibit thrombin-induced endothelin-1 production in human vascular endothelial cells by inhibiting the activator protein-1 signaling pathway. *Circ Res* 1999; 85: 394-402.

**Desvergne B, Wahli W.** Peroxisome proliferators-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev* 1999; 20: 649-688.

**Dinchuk JE, Car BD, Focht RJ, Kohnston JJ, Jaffee BD, Covington MB, Contel NR, Eng VM, Collins RJ, Czerniak PM, et al.** Renal abnormalities and an altered inflammatory response in mice lacking cyclooxygenase II. *Nature* 1995; 378: 406-9.



**Diradourian C, Girard J, Pegorier JP.** Phosphorylation of PPARs: from molecular characterization to physiological relevance. *Biochimie* 2005; 87: 33-8.

**Doner A, Fischer B, Frew D, Cumming A, Glavell DM, World M, Montgomery HE, Boyle D, Morris A, Palmer CN.** Haplotype analysis of the PPAR $\gamma$  Pro12Ala and C1431T variants reveals opposint associations with body weight. *BMC Genet* 2002; 3: 21.

**Dumond H, Presle N, Pottier P, Pacquelet S, Terlain B, Netter P, Gepstein A, Livne E, Jouzeau JY.** Site specific changes in gene expression and cartilage metabolism during early experimental osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 2004; 12: 284-295.

## E

---

**Edwards JCW.** The Musculoskeletal System: Synovium. Dans: Klipper JH, Crofford LJ, Stone JH, Weyand CM (eds) *Primer on the Rheumatic Diseases*. Georgia: The Arthritis Foundation. 2001: pp 22-26.

**Ek J, Urhammer SA, Sorensen TI, Andersen T, Auwerx J, Pedersen O.** Homozygosity of the Pro12Ala variant of the peroxisome proliferation-activated receptor- $\gamma$ 2 (PPAR- $\gamma$ 2): divergent modulating effects on body mass index in obese and lean Caucasian men. *Diabetologia* 1999;42:892-895.

**Ekstrom L, Lyrenas L, Jakobsson PJ, Morgenstern R, Kelner MJ.** Basal expression of human MAPEG members microsomal glutathione transferase 1 and prostaglandin E synthase genes is mediated by Sp1 and Sp3. *Biochim Biophys Acta* 2003; 1627: 79-84.

## F

---

**Fahmi H, Di Battista JA, Pelletier JP, Mineau F, Ranger P, Martel-Pelletier J.** Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activators inhibit interleukin-1  $\beta$ -induced nitric oxide and matrix metalloproteinase 13 production in human chondrocytes. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 595-607.

**Fahmi H, Pelletier JP, Di Battista JA, Cheung HS, Fernandes J, Martel-Pelletier J.** Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  activators inhibit MMP-1 production in human synovial fibroblasts likely by reducing the binding of the activator protein 1. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10: 100-8.

**Fahmi H, Pelletier JP, Mineau F, Martel-Pelletier J.** 15d-PGJ(2) is acting as a "dual agent" on the regulation of COX-2 expression in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2002; 10: 845-8.

**Fahmi H, Pelletier JP, Martel-Pelletier J.** PPAR $\gamma$  ligands as modulators of inflammatory and catabolic responses in arthritis. An overview. *J Rheumatol* 2002; 29: 3-14.

**Farrajota K, Cheng S, Martel-Pelletier J, Afif H, Pelletier JP, Li X, Ranger P, Fahmi H.** Inhibition of interleukin-1 $\beta$ -induced cyclooxygenase 2 expression in human synovial fibroblasts by 15-deoxy-Delta<sup>12,14</sup>-prostaglandin J<sub>2</sub> through a histone deacetylase-independent mechanism. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 94-104.

**Felmeden DC, Lip GY.** Antithrombotic therapy in hypertension: a Cochrane Systematic review. *J Hum Hypertens* 2005; 19: 185-196.

**Felson DT, Chaisson CE.** Understanding the relationship between body weight and osteoarthritis. *Baillieres Clin Rheumatol* 1997; 11: 671-681.

**Felson DT, Zhang Y.** An update on the epidemiology of knee and hip osteoarthritis with a view to prevention. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 1343-1355.

**Felson DT, Neogi T.** Osteoarthritis: is it a disease of cartilage or bone? *Arthritis Rheum* 2004; 50: 341-344.

**Felson DT.** Risk factors for osteoarthritis: understanding joint vulnerability. *Clin Orthop Relat Res* 2004; 427 Suppl: S16-21.

**Fernandes I, White JH.** Agonist-bound nuclear receptors: not just targets of coactivators. *J Mol Endocrinol* 2003; 31: 1-7.

**Forsberg L, Leeb L, Thoren S, Morgentern R, Jakobsson JP.** Human glutathione dependent prostaglandin E synthase: gene structure and regulation. *FSSB Lett* 2000; 471: 78-82.

**François M, Richette P, Tsagris L, Raymondjean M, Marie-Claude Fulchignoni-Lataud MC, Forest C, Savouret JF, Corvol MT.** Peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  down-regulates chondrocyte matrix metalloproteinase-1 via a novel composite element. *J Biol Chem* 2004; 279: 28411-8.

**Fu M, Wang C, Zhang X, Pestell RG.** Acetylation of nuclear receptors in cellular growth and apoptosis. *Biochem Pharmacol* 2000; 68:1199-208.

## G

---

**Garnero P, Rousseau JC, Delmas PD.** Molecular basis and clinical use of biochemical markers of bone, cartilage, and synovium in joint diseases. *Arthritis & Rheum* 2000; 43: 953-968.

**Giannico G, Mendez M, LaPointe MC.** Regulation of the membrane-localized prostaglandin E synthases mPGES-1 and mPGES-2 in cardiac myocytes and fibroblasts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288: H165-174.

**Gill SE, Bonnet CS, Suri S, Wilson D, Walsh DA.** Neurovascular invasion at the osteochondral junction in osteoarthritis. *Rheumatology* 2004; 43: ii5.

**Gilroy DW, Colville-Nash PR, Willis D, Chivers J, Paul-Clark MJ, Willoughby DA.** Inducible cyclooxygenase may have anti-inflammatory properties. *Nat Med* 1999; 5: 698-701.

**Giovannucci E.** The prevention of colorectal cancer by aspirin use. *Biomed Pharmacother* 1999; 53: 303-308.

**Goetzl EJ, An S, Zeng L.** Specific suppression by prostaglandin E<sub>2</sub> of activation-induced apoptosis of human CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> T lymphocytes. *J Immunol* 1995; 154: 1041-7.

**Goldring MB.** The role of chondrocytes in osteoarthritis. *Arthritis & Rheum* 2000; 43: 1916-1926.

**Goldring MB.** The Musculoskeletal System: Articular Cartilage. Dans: Klipper JH, Crofford LJ, Stone JH, Weyand CM (eds) *Primer on the Rheumatic Diseases*. Georgia: The Arthritis Foundation, 2001: pp 10-16.

**Grynpas MD, Alpert B, Katz I, Lieberman I, Pritzker KP.** Subchondral bone in osteoarthritis. *Calcif Tissue Int* 1991; 49: 341-344.

**Guan Y, Zhang Y, Schneider A, Riendeau D, Mancini JA, Davis L, Komhoff M, Breyer RM, and Breyer MD.** Urogenital distribution of a mouse membrane-associated prostaglandin E(2) synthase. *Am J Physiol Renal Physiol* 2001; 281: F1173-7.

## H

---

**Hannan MT, Felson DT, Pincus T.** Analysis of the discordance between radiographic changes and knee pain in osteoarthritis of the knee. *J Rheumatol* 2000; 27: 1513-1517.

**Harada Y, Hatanaka K, Kawamura M, Saito M, Ogino M, Majima M, Ohno T, Ogino K, Yamamoto K, Taketani Y, Yamamoto S, Satori M.** Role of prostaglandin H synthase-2 in prostaglandin E2 formation in rat carrageenin-induced pleurisy. *Prostaglandins* 1996; 51: 19-33.

**Harrington JJ, Ludikhuize J, Tak PP.** Chemokines in joint disease: the key to inflammation? *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1186-1194.

**Harris SG, Phipps RP.** Peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) activation in naive mouse T cells induces cell death. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 905:297-300.

**Hart DJ, Spector TD.** The classification and assessment of OA. *Baillieres Clin Rheumatol* 1995; 9: 407-432.

**Herrmann SM, Ringel J, Wang JG, Staessen JA, Brand E.** Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 polymorphism Pro12Ala is associated with nephropathy in type 2 diabetes: The Berlin Diabetes Mellitus (BeDiaM) Study. *Diabetes* 2002; 51: 2653-2657.

**Hong J, Samudio I, Abdelrahim M, Safe S.** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma-dependent activation of p21 in Panc-28 pancreatic cancer cells involves Sp1 and Sp4 proteins. *Endocrinology* 2004; 145: 5774-5785.

## J

---

**Jakobsson PJ, Thorén S, Morgenstem R, Samuelsson B.** Identification of human prostaglandin E synthase: a microsomal, glutathione-dependent, inducible enzyme, constituting a potential novel drug target. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96: 7220.

**Ji JD, Cheon H, Jun JB, Choi SJ, Kim YR, Lee YH, Kim TH, Chae IJ, Song GG, Yoo DH, Kim SY, Sohn J.** Effects of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) on the expression of inflammatory cytokines and apoptosis induction in rheumatoid synovial fibroblasts and monocytes. *J Autoimmun* 2001; 17: 215-21.

**Jiang G, Dallas-Yang Q, Li Z, Szalkowski D, Liu F, Shen X, Wu M, Zhou G, Doebber T, Berger J, Moller DE, Zhang BB.** Potentiation of insulin signaling in tissues of Zucker obese rats after acute and long-term treatment with PPARgamma agonists. *Diabetes* 2002; 51: 2412-2419.

**Jones G, Ding C, Scott F, Cicuttini F.** Genetic mechanisms of knee osteoarthritis: a population based case-control study. *Ann Rheum Dis* 2004; 63: 1255-1259.

**K**

---

**Kamei Y, Xu L, Heinzel T, Torchia J, Kurokawa R, Gloss B, Lin SC, Heyman RA, Rose DW, Glass CK, Rosenfeld MG.** A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptor. *Cell* 1996; 85: 403-14.

**Kamei D, Yamakawa K, Takegoshi Y, Mikami-Nakanishi M, Nakatani Y, Oh-Ishi S, Yasui H, Azuma Y, Hirasawa N, Ohuchi K, Kawaguchi H, Ishikawa Y, Ishii T, Uematsu S, Akira S, Murakami M, Kudo I.** Reduced pain hypersensitivity and inflammation in mice lacking microsomal prostaglandin E synthase-1. *J Biol Chem* 2004; 279:33684-33695.

**Kato T, Xiang Y, Nakamura H, Nishioka K.** Neoantigens in osteoarthritic cartilage. *Curr Opin Rheumatol* 2004; 16: 604-608.

**Kawahito Y, Kondo M, Tsubouchi Y, Hashiramoto A, Bishop-Bailey D, Inoue K, Kohno M, Yamada R, Hla T, Sano H.** 15-deoxy-delta(12,14)-PGJ(2) induces synoviocyte apoptosis and suppresses adjuvant-induced arthritis in rats. *J Clin Invest* 2000; 106: 189-197.

**Kawao N, Nagatani M, Nagasawa K, Cubo S, Cushing K, Wada T, Kekiguchi F, Hollenberg MD, Macnaughton WK, Nishikawa H, Kawabata A.** Signal transduction for proteinase-activated receptor-2-triggered prostaglandin E2 formation in human lung epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 2005; 315: 576-89.

**Karin M.** The NF-kappaB activation pathway: its regulation and role in inflammation in cell survival. *Cancer J Sci Am* 1998; 4: S92-9.

**Kliwer SA, Lenhard JM, Willson TM, Patel I, Morris DC, Lehmann JM.** A prostaglandin J2 metabolite binds peroxisome proliferator-activated receptor gamma and promotes adipocyte differentiation. *Cell* 1995; 83: 813-819.

**Kliwer SA, Sundseth SS, Jones SA, Brown PJ, Wisely GB, Koble CS, Devchand P, Wahli W, Willson TM, Lenhard JM, Lehmann JM.** Fatty acids and eicosanoids regulate gene expression through direct interactions with peroxisome proliferator-activated receptors alpha and gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997; 94: 4318-23.

**Knouff C, Auwerx J.** Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma calls for activation in moderation: lessons from genetics and pharmacology. *Endoc Rev* 2004; 25: 899-918.

**Kobayahi T, Notoya K, Naito T, Unno S, Nakamura A, Martel-Pelletier J, Pelletier JP.** Pioglitazone, peroxisome proliferator-activated receptor gamma agonist, reduces the progression of experimental osteoarthritis in guinea pigs. *Arthritis Rheum* 2005; 52: 479-487.

**Kodera Y, Takeyama K, Murayama A, Suzawa M, Masuhiro Y, Kato S.** Ligand type-specific interactions of peroxisome proliferator-activated receptor gamma with transcriptional coactivators. *J Biol Chem* 2000; 275: 33201-4.

**Kojima F, Naraba H, Sasaki Y, Okamoto R, Koshino T, Kawai S.** Coexpression of microsomal prostaglandin E synthase with cyclooxygenase-2 in human rheumatoid synovial cells. *J Rheumatol* 2002; 29: 1836-1842.

**Kojima F, Naraba H, Sasaki Y, Beppu M, Aoki H, and Kawai S.** Prostaglandin E2 is an enhancer of interleukin-1beta-induced expression of membrane-associated prostaglandin E synthase in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum* 2003; 48: 2819-2828.

**Korhonen S, Heinonen S, Hiltunen M, Helisalmi S, Hippelainen M, Koivunen R, Tapanainen JS, Laakso M.** Polymorphism in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene in women with polycystic ovary syndrome, *Hum Reprod* 2003; 18: 540-543.

**Kota BP, Huang TH, Roufogalis BD.** An overview on biological mechanisms of PPARs. *Pharmacol Res* 2005; 51: 85-94.

**Kraemer SA, Meade EA, DeWitt DL.** Prostaglandin endoperoxide synthase gene structure: identification of the transcriptional start site and 5'-flanking regulatory sequences. *Arch Biochem Biophys* 1992;293:391-400.

**Kudo I, Murakami M.** Prostaglandin E Synthase, a terminal enzyme for prostaglandin E2 biosynthesis. *J Biochem Mol Biol* 2005; 38: 633-638.

## L

---

**Lagacé C, Perrucio A, Desmeules M, Badley E.** The Impact of Arthritis in Canada. Dans: *Arthritis in Canada: An Ongoing Challenge*. Health Canada, 2003; pp 7-34.  
[http://www.acreu.ca/pdf/Arthritis\\_in\\_Canada.pdf#toc-fig](http://www.acreu.ca/pdf/Arthritis_in_Canada.pdf#toc-fig)

**Langenbach R, Morham SG, Tianio HF, Loftin CD, Ghanayem BI, Chulada PC, Mahler JF, Lee CA, Goulding EH, Kluckman KD, Kim HS, Smithies O.** Prostaglandin synthase-1 gene disruption in mice reduces arachidonic acid-induced inflammation and indomethacin-induced gastric ulceration. *Cell* 1995;83:483-92.

**Langenbach R, Loftin CD, Lee C, Tianio H.** Cyclooxygenase deficient mice. A summary of their characteristics and susceptibilities to inflammation and carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 1999;889:52-61.

**Laufer S.** Role of eicosanoids in structural degradation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2003; 15: 623-7.

**Levick JR.** Blood flow and mass transport in synovial joints. Dans: Renkin EM, Michel CC (eds) *Handbook of physiology, Vol IV, Microcirculation, Part 2.* Bethesda, MD: American Physiological Society, 1984; pp 917-947.

**Li M, Pascual G, Glass CK.** Peroxisome proliferators-activated receptor  $\gamma$ -dependent repression of the inducible nitric oxide synthase gene. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 4699-707.

**Li S, Chen W, Srinivasan SR, Boerwinkle E, Berenson GS.** The peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  gene polymorphism (Pro12Ala) beneficially influences insulin resistance and its tracking from childhood to adulthood: the Bogalusa Heart Study. *Diabetes* 2003; 52: 1265-1269.

**Lindblad S, Hedfors E.** Arthroscopic and immunohistologic characterization of knee joint synovitis in osteoarthritis. *Arthritis Rheumatol* 1987; 30: 1081-1088.

**Liou JY, Shyue SK, Tsai MJ, Chung CL, Chu KY, Wu KK.** Colocalization of prostacyclin synthase with prostaglandin H synthase-1 (PGHS-1) but not phorbol ester-induced PGHS-2 in cultured endothelial cells. *J Biol Chem.* 2000 ;275: 15314-20.

**Liou JY, Deng WG, Gilroy DW, Shyue SK, Wu KK.** Colocalization and interaction of cyclooxygenase-2 with caveolin-1 in human fibroblasts. *J Biol Chem* 2001; 276: 34975-82.

**Loughlin J, Shinsheimer JS, Mustafa Z, Carr AJ, Clipsham K, Bloomfield VA, Chitnavis J, Bailey A, Sykes B, Chapman K.** Association analysis of the vitamin D receptor gene, the type I collagen gene COL1A1 and the estrogen receptor gene in idiopathic osteoarthritis. *J Rheumatol* 2000; 27: 779-784.

**Loughlin J.** Genetic epidemiology of primary osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 2001; 13: 111-116.

**Loughlin J.** Genome studies and linkage in primary osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2002; 28: 95-109.

**Luan J, Browne PO, Harding AH, Halsall DJ, O'Rahilly S, Chatterjee VK, Wareham NJ.** Evidence for gene-nutrient interaction at the PPAR $\gamma$  locus. *Diabetes* 2001; 50: 686-689.

**M**

---

**Magen E, Viskoper JR, Mishal J, Priluk R, London D, Yosefy C.** Effects of low-dose aspirin on blood pressure and endothelial function of treated hypertensive hypercholesterolaemic subjects. *J Hum Hypertens* 2005; 19: 352-361.

**Mancini JA, Waterman H, Riendeau D.** Cellular oxygenation of 12-hydroxyeicosatetraenoic acid and 15-hydroxyeicosatetraenoic acid by 5-lipoxygenase is stimulated by 5-lipoxygenase-activating protein. *J Biol Chem* 1998; 273: 32842-7.

**Mancini JA, Blood K, Guay J, Gordon R, Claveau D, Chan CC, Riendeau D.** Cloning, expression, and up-regulation of inducible rat prostaglandin E synthase during lipopolysaccharide-induced pyresis and adjuvant-induced arthritis. *J Biol Chem* 2001; 276: 4469-75.

**Mapp PI, Klocke R, Walsh DA, Chana JK, Stevens CR, Gallagher PJ, Blake DR.** Localization of 3-nitrotyrosine to rheumatoid and normal synovium. *Arthritis Rheum* 2001; 44: 1534-1539.

**Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H.** Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Semin Arthritis Rheum* 2003; 33: 156-167.

**Masoudi FA, Inzucchi SE, Wang Y, Havranek EP, Foody JM, Krumholz HM.** Thiazolidinediones, metformin, and outcomes in older patients with diabetes and heart failure: an observational study. *Circulation* 2005; 111: 583-590.

**Masugi J, Tamori Y, Mori H, Koike T, Kasuga M.** Inhibitory effect of a proline-to-alanine substitution at codon 12 of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 on thiazolidinedione-induced adipogenesis. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 268: 178-182.

**Masuko-Hongo K, Berenbaum F, Humbert L, Salvat C, Goldring MB, Thirion S.** Up-regulation of microsomal prostaglandin E synthase in human osteoarthritis-affected cartilage: critical roles of the ERK1/2 and p38 pathways. *Arthritis Rheum* 2004; 50: 2829-38.

**Mayne R.** Structure and function of collagen. Dans: Koopman WJ (eds). *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997; 207-227.

**Mbalaviele G, Abu-Amer Y, Meng A, Jaiswal R, Beck S, Pittenger MF, Thiede MA, Marshak DR.** Activation of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma pathway inhibits osteoclast differentiation. *J Biol Chem* 2000; 275: 14388-93.



**McKenna NJ, and O'Malley BW.** Minireview: Nuclear Receptor Coactivators - An Update. *Endocrinology* 2000; 143: 2461-2465.

**MedicineNet.com**

([http://www.medicinenet.com/cortisone\\_injection/page2.htm](http://www.medicinenet.com/cortisone_injection/page2.htm))

**Memisoglu A, Hu FB, Hankinson SE, Manson JE, DeVivo I, Willett WC, Hunter DJ.** Interaction between a peroxisome proliferators-activated receptor gamma gene polymorphism and dietary fat intake in relation to body mass. *Human Mol Genet* 2003; 12: 2923-2929.

**Meirhaeghe A, Fajas L, Helbecque N, Cottel D, Lebel P, Dallongeville J, Deeb S, Auwerx J, Amoyuel P.** A genetic polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene influences plasma leptin levels in obese humans. *Hum Mol Genet* 1998; 7: 435-440.

**Meirhaeghe A, Amouyel P.** Impact of genetic variations of PPARgamma in humans. *Mol Gen Metab* 2004; 83: 93-102.

**Meirhaeghe A, Tanck MW, Fajas L, Janot C, Helbecque N, Cottel D, Auwerx J, Amouyel P, Dallongeville J.** Study of a new PPARgamma2 promoter polymorphism and haplotype analysis in a French population. *Mol Genet Metab* 2005; 85: 140-148.

**Morham SG, Langenbach R, Lottin CD, Tiano HF, Vouloumanos N, Jennette JC, Mahler JF, Kluckman KD, Ledford A, Lee CA, Smithies O.** Prostaglandin synthase 2 gene disruption causes severe renal pathology in the mouse. *Cell* 1995; 83: 473-82.

**Mori H, Ikegami H, Kawaguchi Y, Seino S, Yokoi N, Takeda J, Inoue I, Seino Y, Yasuda K, Hanafusa T, Yamagata K, Awata T, Kadowaki T, Hara K, Yamada N, Gotoda T, Iwasaki N, Iwamoto Y, Sanke T, Nanjo K, Oka Y, Matsutani A, Maeda E, Kasuga M.** The Pro12 to Ala substitution in PPAR (gamma) is associated with resistance to development of diabetes in the general population: possible involvement in impairment of insulin secretion in individuals with type 2 diabetes. *Diabetes* 2001; 50: 891-894.

**Morita I, Schindler M, Regier MK, Otto JC, Hori T, DeWitt DL, Smith WL.** Different intracellular locations for prostaglandin endoperoxide H synthase-1 and -2. *J Biol Chem* 1995; 270: 10902-8.

**Morita I.** Distinct functions of COX-1 and COX-2. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; 68-69: 165-75.

**Mow VC, Roth V, Armstrong CG.** Biomechanics of joint cartilage. Dans: Frankel VH, Nordin M (eds). *Basic Biomechanics of the Skeletal System*. Philadelphia: Lea & Febiger, 1980: pp 61-86.

**Murakami M, Kambe T, Shimbara S, Kudo I.** Functional coupling between various phospholipase A2s and cyclooxygenases in immediate and delayed prostanoid biosynthetic pathways. *J Biol Chem* 1999; 274: 3103-3115.

**Murakami M, Naraba H, Tanioka T, Semmyo N, Nakatani Y, Kojima F, Ikeda T, Fueki M, Ueno A, Oh S, Kudo I.** Regulation of prostaglandin E<sub>2</sub> biosynthesis by inducible membrane-associated prostaglandin E<sub>2</sub> synthase that acts in concert with cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 2000; 275: 32783-92.

**Murakami M, Nakatani Y, Tanioka T, Kudo I.** Prostaglandin E synthase. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; 68-69: 383-399.

**Murakami M, Nakashima K, Kamei D, Masuda S, Ishikawa Y, Ishii T, Ohmiya Y, Watanabe K, Kudo I.** Cellular prostaglandin E<sub>2</sub> production by membrane-bound prostaglandin E synthase-2 via both cyclooxygenases-1 and -2. *J Biol Chem* 2003; 278: 37937-47.

## N

---

**Naraba H, Yokoyama C, Tago N, Murakami M, Kudo I, Fueki M, Oh-ishi S, Tanabe T.** Transcriptional regulation of the membrane-associated prostaglandin E<sub>2</sub> synthase gene. Essential role of the transcription factor Egr-1. *J Biol Chem* 2002; 277: 28601-28608.

**Narumiya S, Ohno K, Fujiwara M, Fukushima M.** Site and mechanism of growth inhibition by prostaglandins. II. Temperature-dependent transfer of a cyclopentenone prostaglandin to nuclei. *J Pharmacol Exp Ther* 1986; 239: 506-511.

**Narumiya S, Sugimoto Y, and Ushikubi F.** Prostanoid receptors: structures, properties, and functions. *Physiol Rev* 1999; 79: 1193-226.

**Nihiro H, Osuka T, Izuhara K, Yamaoka K, Ohshima K, Tanabe T, Hara S, Nemoto Y, Tanaka Y, Nakashima H, Niho Y.** Regulation by interleukin-10 and interleukin-4 of cyclooxygenase-2 expression in human neutrophils. *Blood* 1997; 89: 1621-8.

**Niissalo S, Hukkanen M, Imai S, Tornwall J, Kontinen YT.** Neuropeptides in experimental and degenerative arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966: 384-399.

**Notoya K, Jovanovic DV, Reboul P, Martel-Pelletier J, Mineau F, Pelletier JP.** The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E<sub>2</sub> via the induction of cyclooxygenase-2. *J Immunol* 2000; 165: 3402-10.

## O

---

**Oates JC, Gilkeson GS.** Mediators of inflammation, tissue destruction, and repair: Arachidonic acid derivatives, reactive oxygen species, and other mediators. Dans: Lanza R, Langer R, Chick W (eds). *Principles in Tissue Engineering*. Austin TX: R.G. Landes Company, 1997; pp. 81-88.

**Ogawa S, Urano T, Hosoi T, Miyao M, Hoshino S, Fujita M, Shiraki M, Orimo H, Ouchi Y, Inoue S.** Association of bone mineral density with a polymorphism of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma gene: PPARgamma expression in osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 1999; 260: 122-126.

**Okada M, Yan SF, Pinsky DJ.** Peroxisome proliferator-activated receptor-gamma (PPAR-gamma) activation suppresses ischemic induction of Egr-1 and its inflammatory gene targets. *FASEB J* 2002; 16: 1861-1868.

**Olsen BR.** Matrix molecules and their ligands. Dans: Lanza R, Langer R, Chick W (eds). *Principles in Tissue Engineering*. Austin TX: R.G. Landes Company, 1997; pp. 47-65.

**O'Keefe RJ, Crabb ID, Puzas JE, Posier RN.** Influence of prostaglandins on DNA and matrix synthesis in growth plate chondrocytes. *J Bone Miner Res* 1992; 7: 397-404.

**O'Neill C.** The biochemistry of prostaglandins: a primer. *Aust N Z J Obstet Gynaecol.* 1994; 34: 332-337.

## P

---

**Padilla J, Kaur K, Harris SG, Phipps RP.** PPARγ-mediated regulation of normal and malignant B lineage cells. *Ann N Y Acad Sci* 2000; 905: 97-109.

**Peach CA, Carr AJ, Loughlin J.** Recent genetics in the genetic investigation of osteoarthritis. *Trends Mol Med* 2005; 11: 186-91.

**Perez-Sala D, Cernuda-Morollon E, Canada FG.** Molecular basis for the direct inhibition of AP-1 DNA binding by 15-deoxy-Delta 12,14-prostaglandin J2. *J Biol Chem* 2003; 278: 51251-21560.

**Portanova JP, Zhang Y, Anderson GD, Hauser SD, Masferrer JL, Seibert K, Gregory SA, Isakson PC.** Selective neutralization of prostaglandin E<sub>2</sub> blocks inflammation, hyperalgesia, and interleukin-6 production in vivo. *J Exp Med* 1996; 184: 883-91.

**Q**

---

**Qi C, Surapureddi S, Zhu YZ, Yu S, Kashireddy P, Rao MS, Reddy JK.** Transcriptional coactivator PRIP, the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma)-interacting protein, is required for PPARgamma-mediated adipogenesis. *J Biol Chem* 2003; 278: 25281-4.

**Quraishi O, Mancini JA, Riendeau D.** Inhibition of inducible prostaglandin E(2) synthase by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J(2) and polyunsaturated fatty acids. *Biochem Pharmacol* 2002; 63: 1183-9.

**R**

---

**Radin EL.** Mechanics of joint degeneration. Dans: Radin EL, Simon SR, Rose RM, Paul IL (eds). *Practical Biomechanics for Orthopedic Surgeon*. New York: John Wiley & Sons, 1979.

**Revell PA, Al-Saffar N, Fish S, Osei D.** Extracellular matrix of the synovial intimal cell layer. *Ann Rheum Dis* 1995; 54: 404-407.

**Ridker PM, Cook NR, Cheng S, Erlich HA, Lindpaintner K, Plutzky J, Zee RY.** Alanine for proline substitution in the peroxisome proliferator-activated receptor gamma-2 (PPARG2) gene and the risk of incident myocardial infarction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2003;23:859-863.

**Robinson-Rechavi M, Garcia HE, Laudet V** The nuclear receptor superfamily. *J Cell Sci* 2003; 116:585-586.

**Rolli M, Kotlyarov A, Sakamoto KM, Gaestel M, Neininger A.** Stress-induced stimulation of early growth response gene-1 by p38/stress-activated protein kinase 2 is mediated by a cAMP-responsive element in a MAPKAP kinase 2-independent manner. *J Biol Chem* 1999; 274: 19559-19564.

**Rossi A, Kapahi P, Natoli G, Takahashi T, Chen Y, Karin M, Santoro MG.** Anti-inflammatory cyclopentenone prostaglandins are direct inhibitors of I $\kappa$ B kinase. *Nature* 2000; 403: 103-8.

S

---

**Sakuma Y, Tanaka K, Suda M, Yasoda A, Natsui K, Tanaka I, Ushikubi F, Narumiya S, Segi E, Sugimoto Y, Ichikawa A, Nakao K.** Crucial involvement of the EP4 subtype of prostaglandin E receptor in osteoclast formation by proinflammatory cytokines and lipopolysaccharide. *J Bone Miner Res* 2000; 15: 218-227.

**Sandy JD, Plaas AHK, Rosenberg L.** Structure, function, and metabolism of cartilage proteoglycans. Dans: Koopman WJ (eds). *Arthritis and Allied Conditions: A Textbook of Rheumatology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997; pp. 255-308.

**Schaible HG, Ebersberger A, Von Blanchet GS.** Mechanism of Pain in Arthritis. *Ann N Y Acad Sci* 2002; 966: 343-354.

**Shafteel SS, Olschowka JA, Hurley SD, Moore AH, O'Banion MK.** COX-3: a splice variant of cyclooxygenase-1 in mouse neural tissue and cells. *Brain Res Mol Brain Res* 2003; 119: 213-5.

**Shakhov AN, Collart MA, Vassalli P, Nedospasov SA, Jongeneel CV.** Kappa B-type enhancers are involved in lipopolysaccharide-mediated transcriptional activation of the tumor necrosis factor alpha gene in primary macrophages. *J Exp Med* 1990; 171: 35-47.

**Shan ZZ, Masuko-Hongo K, Dai SM, Nakamura H, Kato T, Nishioka K.** A potential role of 15-deoxy-delta(12,14)-prostaglandin J2 for induction of human articular chondrocyte apoptosis in arthritis. *J Biol Chem* 2004; 279: 37939-50.

**Shinomiya S, Naraba H, Ueno A, Utsunomiya I, Maruyama T, Uhuchida S, Ushikubi F, Yuki N, Narumiya S, Sugimoto Y, Ichikawa A, Oh-ishi S.** Regulation of TNF $\alpha$  and interleukin-10 production by prostaglandin I<sub>2</sub> and E<sub>2</sub>: studies with prostaglandin receptor-deficient mice and prostaglandin E-receptor subtype synthetic agonists. *Biochem Pharmacol* 2001; 61: 1153-1160.

**Shiojiri T, Wada K, Nakajima A, Katayama K, Shibuya A, Kudo C, Kadowaki T, Mayumi T, Yura Y, Kamisaki Y.** PPAR gamma ligands inhibit nitrotyrosine formation and inflammatory mediator expressions in adjuvant-induced rheumatoid arthritis mice. *Eur J Pharmacol* 2002; 448: 231-238.

**Siegle I, Klein T, Backman JT, Saal JG, Nusing RM, Fritz P.** Expression of cyclooxygenase 1 and cyclooxygenase 2 in human synovial tissue: differential elevation of cyclooxygenase 2 in inflammatory joint diseases. *Arthritis Rheum* 1998; 41: 122-129.

**Silverman ED, Du J, Williams AJ, Wadgaonkar R, Drazen JM, Collins T.** cAMP-response-element-binding-protein-binding protein (CBP) and p300 are transcriptional co-activators of early growth response factor-1 (Egr-1). *Biochem J* 1998; 336 (Pt I): 183-189.

**Simkim PA.** The Musculoskeletal System: Joints. Dans: Klipper JH, Crofford LJ, Stone JH, Weyand CM (eds) *Primer on the Rheumatic Diseases*. Georgia: The Arthritis Foundation, 2001. pp 5-9.

**Simkim PA.** The musculoskeletal system. Dans: Hochberg MC, Silman AJ, Smolen JS, Weinblatt ME, Weisman MH (eds) *Rheumatology*. London: Mosby, 2003. pp.57-68.

**Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM.** Cyclooxygenases: structural, cellular, and molecular biology. *Annu Rev Biochem* 2000; 69: 145-182.

**Smith WL, Langenbach R.** Why there are two cyclooxygenase isozymes. *J Clin Invest* 2001; 107: 1491-1495.

**Song J, Sakatsume M, Narita I, Goto S, Omori K, Takada T, Saito N, Ueno M, Gejyo F.** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma C161T polymorphisms and survival of Japanese patients with immunoglobulin A nephropathy. *Clin Genet* 2003; 64: 398-403.

**Sotckwell RA, Meachim G.** The chondrocytes. Dans: Freeman MAR (ed). *Adult Articular Cartilage*. Turbridge Wells, England: Pitman Medical, 1979; pp. 69-144.

**Soler M, Camacho M, Escudero JR, Iniguez MA, Vila L.** Human vascular smooth muscle cell but not endothelial cells express prostaglandin E synthase. *Circ Res* 2000; 87: 504-507.

**Spector TD, Cicuttini F, Baker J, Loughlin J, Hart D.** Genetic influences on osteoarthritis in women: a twin study. *BMJ* 1996; 312: 940-943.

**Sperling RI.** Eicosanoids in rheumatoid arthritis. *Rheum Dis Clin North Am.* 1995 ; 21: 741-58.

**Staels B, Fruchart JC.** Therapeutic roles of peroxisome proliferator-activated receptor agonists. *Diabetes* 2005; 54: 2460-70.

**Stevens CR, Williams RV, Farrell AJ, Blake DE.** Hypoxia and inflammatory synovitis: observations and speculation. *Ann Rheum Dis* 1991; 28: 1096-1104.

**Stichtenoth DO, Thoren S, Bian H, Peters-Golden M, Jakobsson PJ, Crofford LJ.** Microsomal prostaglandin E synthase is regulated by proinflammatory cytokines and glucorticoids in primary rheumatoid synovial cells. *J Immunol* 2001; 167: 469-474.

**Stichtenoth DO, Frolich JC.** The second generation of COX-2 inhibitors: what advantages does the newest offer? *Drugs* 2003; 63: 33-45.

**Stokes J, Desjardins S, Perricio A.** Economic Burden. Dans: *Arthritis in Canada: An Ongoing Challenge*. Health Canada, 2003; pp 42-49.

[http://www.acreu.ca/pdf/Arthritis\\_in\\_Canada.pdf#toc-fig](http://www.acreu.ca/pdf/Arthritis_in_Canada.pdf#toc-fig)

**Straus DS, Pascual G, Li M, Welch JS, Ricote M, Hsiang CH, Sengchanthalangsy LL, Ghosh G, Glass CK.** 15-deoxy-delta 12,14-prostaglandin J<sub>2</sub> inhibits multiple steps in the NF-kappa B signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 4844-9.

**Subbaramaiah K, Yashimatsu K, Scherl E, Das KM, Glazier KD, Golijanin D, Soslow RA, Tanabe T, Naraba H, Dannenberg AJ.** Microsomal prostaglandin E synthase-1 is overexpressed in inflammatory bowel disease. Evidence for involvement of the transcription factor Egr-1. *J Biol Chem* 2004; 279: 12647-12658.

**Stumvoll M, Haring H.** The peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2 Pro12Ala polymorphism. *Diabetes* 2002; 51: 2341-7.

**Sugimoto Y, Narumiya S, Ichikawa A.** Distribution and function of prostanoid receptors: studies from knockout mice. *Prog Lipid Res* 2000; 39: 289-314.

## T

---

**Takinawa N, Ohmiya Y, Ohkubo H, Hashimoto K, Kangawa K, Kojima M Ito S, Watanabe K.** Identification and characterization of a novel type of membrane-associated prostaglandin E synthase. *Biochem Biophys Res Commun* 2002; 291: 884-889.

**Tanabe T, Tohnai N.** Cyclooxygenase isozymes and their gene structures and expression. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2002; 69-69: 95-114.

**Tanaka T, Yamamoto J, Iwasaki S, Asaba H, Hamura H, Ikeda Y, Watanabe M, Magoori K, Ioka RX, Tachibana K, Watanabe Y, Uchiyama Y, Sumi K, Iguchi H, Ito S, Doi T, Hamakubo T, Naito M, Auwerx J, Yanagisawa M, Kodama T, Sakai J.** Activation of peroxisome proliferator-activated receptor delta induces fatty acid beta-oxidation in skeletal muscle and attenuates metabolic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 15924-9.

**Tanioka T, Nakatani Y, Semmyo N, Murakami M, and Kudo I.** Molecular identification of cytosolic prostaglandin E<sub>2</sub> synthase that is functionally coupled with cyclooxygenase-1 in immediate E<sub>2</sub> biosynthesis. *J Biol Chem* 2000; 275: 32775-32782.

**Temelkova-Kurktschiev T, Hanefeld M, Chinetti G, Zawadzki C, Haulon S, Kubaszek A, Koelher C, Leonhardt W, Staels B, Laakso M.** Ala12Ala genotype of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma2 protects against atherosclerosis. *J Clin Endocrinol Metab* 2004; 89: 4238-4242.

#### **The Arthritis Society**

([www.arthritis.ca/types%20of%20arthritis/osteoarthritis/default.asp?s=1](http://www.arthritis.ca/types%20of%20arthritis/osteoarthritis/default.asp?s=1))

**Thorén S, Jakobsson PJ.** Coordinate up- and down-regulation of glutathione-dependent prostaglandin E synthase and cyclooxygenase-2 in A549 cells. Inhibition by NS-398 and leukotriene C4. *Eur J Biochem* 2000; 267: 6428-34.

**Thorén S.** Characterization of human glutathione-dependent microsomal prostaglandin E synthase-1. (Thèse de doctorat) Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Division of Chemistry II. Karolinska Institutet, 171 77 Stockholm, Sweden, 2003.

**Thorén S, Weinander R, Saha S, Jegerschöld C, Pettersson PL, Samuelsson B, Hebert H, Hamberg M, Morgenstern R, and Jakobsson PJ.** Human microsomal prostaglandin E synthase-1: purification, functional characterization, and projection structure determination. *J Biol Chem* 2003; 278: 22199-22209.

**Trebino CE, Stock JL, Gibbons CP, Naiman BM, Watchmann TS, Umland JP, Pandher K, Lapointe JM, Saha S, Roach ML, Carter D, Thomas NA, Durtschi BA, McNeish JD, Hambor JE, Jakobsson PJ, Carty TJ, Perez JR, Audoly LP.** Impaired inflammatory and pain responses in mice lacking an inducible prostaglandin E synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003, 100:9044-9049.

**Tsubouchi Y, Kawahito Y, Kohno M, Inoue K, Hla T, Sano H.** Feedback control of the arachidonate cascade in rheumatoid synoviocytes by 15-deoxy-Delta(12,14)-prostaglandin J2. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 283: 750-755.

#### **U**

---

**Uematsu S, Matsumoto M, Takeda K, Akira S.** Lipopolysaccharide-dependent prostaglandin E(2) production is regulated by the glutathione-dependent prostaglandin E(2) synthase gene induced by the Toll-like receptor 4/MyD88/NF-IL6 pathway. *J Immunol* 2002; 168: 5811-5816.

**Uitterlinden AG, Burger H, Huang Q, Odding E, Duijn CM, Hofman A, Birkenhager JC, van Leeuwen JP, Pols HA.** Vitamin D receptor genotype is associated with radiographic osteoarthritis at the knww. *J Clin Invest* 1997; 100: 259-263.



**Ulrich CM, Bigler J, Potter JD.** Non-steroidal anti-inflammatory drugs for cancer prevention : promise, perils and pharmacogenetics. *Nat Rev Cancer* 2006; 6: 130-140.

## V

---

**Valve R, Sivenius K, Miettinen R, Pihlajamaki J, Rissanene A, Deeb SS, Auwerx J, Uusitupa M, Laakso M.** Two common polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor-gamma gene are associated with severe overweight among obese women. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84L: 3708-3712.

**Verzijl J, DeGroot J, Thorpe SR, Bank RA, Shaw JN, Lyons TJ, Bijlsma JWW, Baynes JW, TeKoppele JM.** Effect of collagen turnover on the accumulation of advanced glycation end products. *J Biol Chem* 2000; 275: 39027-31.

**Vigouroux C, Fajas L, Khallouf E, Meier M, Gyapay G, Lascols O, Auwerx J, Weissenbach J, Capeau J, Magre J.** Human peroxisome proliferator-activated receptor-gamma2: genetic mapping, identification of a variant in the coding sequence, and exclusion as the gene responsible for lipotrophic diabetes. *Diabetes* 1998; 47: 490-492.

## W

---

**Wallberg AE, Yamamura S, Malik S, Spigelman BH, Roeder RG.** Coordination of p300-mediated chromatin remodeling and TRAP/Mediator function through coactivator PGC-1alpha. *Mol Cell* 2003; 12: 1137-1149.

**Wallis WJ, Simkim PA, Nelp WB.** Protein traffic in human synovial effusions. *Arthritis Rheum* 1987; 30: 57-63.

**Wang XL, Oosterhof J, Duarte N.** Peroxisome proliferator-activated receptor gamma C161-->T polymorphism and coronary artery disease. *Cardiovasc Res* 1999; 44: 588-594.

**Watanabe K, Kurihara K, Togunaka Y, Hayaishi O.** Two types of microsomal prostaglandin E synthase: glutathione-dependent and -independent prostaglandin E synthases. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 235: 148-52.

**Watanabe K, Kurihara K, Suzuki T.** Purification and characterization of membrane-bound prostaglandin E synthase from bovine heart. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1439: 406-14.

**Way JM, Harrington WW, Brown KK, Gottschalk WK, Sundseth SS, Mansfield TA, Ramachandran RK, Willson TM, Kliewer SA.** Comprehensive messenger ribonucleic acid profiling reveals that peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation has coordinate effects on gene expression in multiple insulin-sensitive tissues. *Endocrinology* 2001; 142: 1269-1277.

**Westacott C.** Interaction between subchondral bone and cartilage in OA. Cells from osteoarthritic bone can alter cartilage metabolism. *J Musculoskel Neuron Interact* 2002; 2: 507-509.

**Wieland HA, Michaelis M, Kirschbaum BJ, Rudolphi KA.** Osteoarthritis – An untreatable disease? *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 331-344.

## X

---

**Xu HE, Lambert MH, Montana VG, Parks DJ, Blanchard SG, Brown PJ, Sternbach DD, Lehmann JM, Wisely GB, Willson TM, Kliewer SA, Milburn MV.** Molecular recognition of fatty acids by peroxisome proliferator-activated receptors. *Cell* 1999; 3: 397-403.

## Y

---

**Yamasaki S, Nakashima T, Kawakami A, Miyashita T, Ida H, Migita K, Nakata K, Eguchi K.** Functional changes in rheumatoid fibroblast-like synovial cells through activation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated signalling pathway. *Clin Exp Immunol* 2002; 129: 379-384.

**Yamasaki S, Nakashima T, Kawakami A, Miyashita T, Tanaka F, Ida H, Migita K, Origuchi T, Eguchi K.** Cytokines regulate fibroblast-like synovial cell differentiation to adipocyte-like cells. *Rheumatology* 2004; 43: 448-452.

**Yamazaki R, Kusunoki N, Matsuzaki T, Hashimoto S, Kawai S.** Nonsteroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in association with activation of peroxisome proliferators-activated receptor gamma in rheumatoid synovial cells. *J Pharmacol Exp Therap* 2002; 302: 18-25.

**Yan SF, Fujita T, Lu J, Okada K, Shan Zhou Y, Mackman N, Pinsky DJ, Stern DM.** Egr-1, a master switch coordinating upregulation of divergent gene families underlying ischemic stress. *Nat Med* 2000; 6: 1355-61.

**Yao J, Mackman N, Edgington TS, Fan ST.** Lipopolysaccharide induction of the tumor necrosis factor-alpha promoter in human monocytic cells. Regulation by Egr-1, c-Jun, and NF-kappaB transcription factors. *J Biol Chem* 1997; 272: 17795-801.

**Yen CJ, Beamer BA, Negri C, Silver K, Brown KA, Yarnall DP, Burns DK, Roth J, Shuldiner AR.** Molecular scanning of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma (hPPAR gamma) gene in diabetic Caucasians: identification of a Pro12Ala PPAR gamma 2 missense mutation. *Biochem Biophys Res Commun* 1997; 241: 270-274.

## **Z**

---

**Zahner G, Harendza S, Muller E, Wolf G, Thaiss F, Stahl RA.** Prostaglandin E2 stimulates expression of matrix metalloproteinase 2 in cultured rat mesangial cells. *Kidney Int* 1997; 51:1116-1123.

**DEMANDE D'AUTORISATION DE RÉDIGER PAR ARTICLES  
ANNEXE III**

**1. Identification de l'étudiant**

Saranette CHENG

**2. Nom de l'unité académique**

Faculté de médecine

**3. Nom du programme**

Programme Sciences biomédicales

**4. Liste des articles proposés**

**Cheng S, Afif H, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Li X, Farrajota K, Lavigne M, Fahmi H.** Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Inhibits Interleukin-1 $\beta$ -induced Membrane-associated Prostaglandin E<sub>2</sub> Synthase-1 Expression in Human Synovial Fibroblasts by Interfering with Egr-1. *J Biol Chem* 2004; 279: 22057-22065.

**Cheng S, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Benderdour M, Fahmi H.** Association of Polymorphisms in the Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Gene and Osteoarthritis of the Knee. *Soumis au Annals of Rheumatic Diseases*.

**5. Signature et déclaration de l'étudiant concernant les articles**

[Signature]

Saranette CHENG

16 DEC 2005

Date

**6. Avis du directeur de recherche**

[Signature]

Hassan Fahmi, Ph.D.

19 décembre 2005

Date

**7. Décision ou recommandation et signature du directeur du programme**

[Signature]

Daniel Lajeunesse, Ph.D.

10 janvier 2006

Date

## SIGNATURE DES COAUTEURS

### Titre du 1<sup>er</sup> article:

Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Inhibits Interleukin-1 $\beta$ -induced Membrane-associated Prostaglandin E<sub>2</sub> Synthase-1 Expression in Human Synovial Fibroblasts by Interfering with Egr-1. *J Biol Chem* 2004; 279: 22057-22065.

### Signature des coauteurs :



Hassan Afif, Ph.D.

18-12-2005

Date



Johanne Martel-Pelletier, Ph.D.

20-12-2005

Date



Jean-Pierre Pelletier, M.D.

20/12/05

Date



Xinfang Li, M.Sc.

27-12-2005

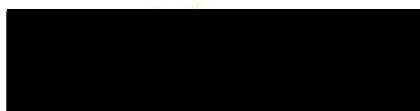
Date



Katherine Farrajota, M.Sc.

16-12-05

Date



Martin Lavigne, M.D.

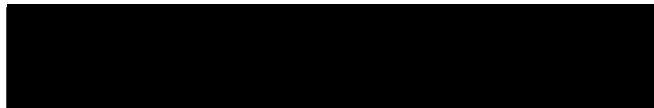
3/1/06

Date

**Titre du 2<sup>ième</sup> article :**

Association of polymorphisms in the peroxisome proliferator-activated receptor- $\gamma$  gene and osteoarthritis of the knee. *Soumis au Annals of Rheumatic Diseases.*

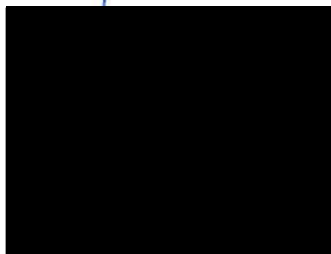
**Signature des coauteurs :**



Johanne Martel-Pelletier, Ph.D.

20-12-2005

Date



Jean-Pierre Pelletier, M.D.

24/12/05

Date

## CONTRIBUTION DES AUTEURS POUR L'ARTICLE :

**Cheng S, Afif H, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Li X, Farrajota K, Lavigne M, Fahmi H.** Activation of Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Inhibits Interleukin-1 $\beta$ -induced Membrane-associated Prostaglandin E<sub>2</sub> Synthase-1 Expression in Human Synovial Fibroblasts by Interfering with Egr-1. *J Biol Chem* 2004; 279: 22057-22065.

**Saranette Cheng :** J'ai exécuté les expériences de Western Blot pour l'analyse de l'expression de la protéine de la mPGES-1. J'ai aussi analysé l'expression de l'ARNm de la mPGES-1 par PCR quantitative en temps réel. De plus, j'ai participé à la correction de cet article.

**Hassan Afif :** Dr. Afif a effectué les expériences de retardement sur gel et aidé au montage des figures de cet article.

**Johanne Martel-Pelletier :** Le Dr. Martel-Pelletier collabore à nos travaux et conseille sur la conception de cet article.

**Jean-Pierre Pelletier :** Le Dr. Pelletier est médecin. Il collabore à nos travaux et nous permet de recevoir des spécimens requis pour nos expériences de laboratoire.

**Xinfang Li :** Xinfang a exécuté les expériences de transfection transitoire et a effectué les expériences d'EIA pour mesurer les niveaux de PGE<sub>2</sub>.

**Katherine Farrajota :** Katherine a effectué les Western Blot pour l'expression des protéines de la cPGES et de la  $\beta$ -actine.

**Martin Lavigne :** Dr. Lavigne est un orthopédiste et il nous permet de recevoir les spécimens requis pour nos expériences de laboratoire.

**Hassan Fahmi :** Dr. Fahmi a supervisé les travaux et a aidé à la conception de cet article.

### CONTRIBUTION DES AUTEURS POUR L'ARTICLE :

**Cheng S, Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H.** Association of Polymorphisms in the Peroxisome Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Gene and Osteoarthritis of the Knee. *Soumis au Annals of Rheumatic Diseases*.

**Saranette Cheng :** J'ai isolé l'ADN génomique des sujets, de même que performé les analyses des polymorphismes du gène de PPAR $\gamma$  par PCR et RFLP. J'ai procédé à la classification et à la stratification des données des sujets à des fins d'analyses statistiques. De plus, j'ai participé à la correction de cet article.

**Johanne Martel-Pelletier :** Le Dr. Martel-Pelletier collabore à nos travaux et conseille sur la conception de cet article.

**Jean-Pierre Pelletier :** Le Dr. Pelletier est médecin. Il collabore à nos travaux et nous permet de recevoir des spécimens requis pour nos expériences de laboratoire.

**Hassan Fahmi :** Dr. Fahmi a supervisé les travaux, procédé aux analyses statistiques des résultats. Il a également effectué la conception de cet article.



 **jbc** ONLINE**Visit APL for all  
your stopped-flow and CD needs.****APL****QUICK SEARCH:** [advanced]**Author:** **Keyword(s):****Go****Year:****Vol:****Page:**

HOME HELP FEEDBACK SUBSCRIPTIONS ARCHIVE SEARCH

Institution: **BIBLIO DE LA SANTE** [Sign In as Member/Non-Member](#)

## Copyright Permission Policy

### **ASBMB Journals**

*Journal of Biological Chemistry**Molecular and Cellular Proteomics**Journal of Lipid Research**Biochemistry and Molecular Biology Education**ASBMB Today*

### **ASBMB does not charge for and grants use without requiring your copyright permission request for:**

- Original authors wanting to reproduce portions of their own work; or to republish their material in not-for-profit formats or venues.
- Students wanting to reproduce or republish their work for educational purposes.
- Students using other authors' material for their theses.
- Reproduction or republication of abstracts only.
- Photocopying up to 5 copies for personal use.
- Non-profit educational institutions making multiple photocopies of articles for classroom use; all such reproduction must utilize institutionally owned equipment for this purpose.

***Use of copyrighted material requires proper citation.*****For all other uses, contact Copyright Clearance Center.**

HOME HELP FEEDBACK SUBSCRIPTIONS ARCHIVE SEARCH

**All ASBMB Journals****Molecular and Cellular Proteomics****Journal of Lipid Research** **Biochemistry and Molecular Biology Education****Copyright © 2005 by the American Society for Biochemistry and Molecular Biology.**

